



Fernanda Gambogi Braga Amarante

**Avaliação da capacidade funcional de eosinófilos
do sangue periférico de pacientes com a forma
juvenil da paracoccidioidomicose**

*“Evaluation of the functional capacity of peripheral blood
eosinophils of patients with the juvenile form of
paracoccidioidomycosis”*

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

Fernanda Gambogi Braga Amarante

**Avaliação da capacidade funcional de eosinófilos do sangue
periférico de pacientes com a forma juvenil da
paracoccidioidomicose**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Heloísa de Souza Lima Blotta

***“Evaluation of the functional capacity of peripheral blood
eosinophils of patients with the juvenile form of
paracoccidioidomycosis”***

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas na área de Concentração em Ciências Biomédicas.

Doctorate thesis presented to the Medical Sciences Postgraduation Programme of the Faculty of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Medical Sciences.

Este exemplar corresponde à versão final da tese de doutorado defendida pela aluna Fernanda Gambogi Braga Amarante e orientada pela Prof^a. Dr^a. Maria Heloísa de Souza Lima Blotta.

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Am13a Amarante, Fernanda Gambogi Braga, 1982-
Avaliação da capacidade funcional de eosinófilos do
sangue periférico de pacientes com a forma juvenil da
paracoccidioidomicose / Fernanda Gambogi Braga
Amarante. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Maria Heloísa de Souza Lima Blotta.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Movimento
celular. 3. Adesão Celular. 4. Quimiocinas. I. Blotta,
Maria Heloísa de Souza Lima. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of the functional capacity of peripheral blood eosinophils of patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis.

Palavras-chave em inglês:

Paracoccidioides brasiliensis

Cell movement

Cell adhesion

Chemokines

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Doutora em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Maria Heloísa de Souza Lima Blotta [Orientador]

Heloísa Helena de Araújo Ferreira

Gil Benard

Nicola Amanda Conran Zorzetto

Maria Letícia Cintra

Data da defesa: 27-07-2012

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Fernanda Gambogi Braga Amarante

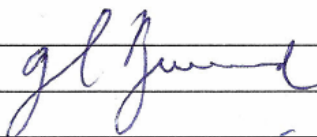
Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria Heloísa de Souza Lima Blotta

Membros:

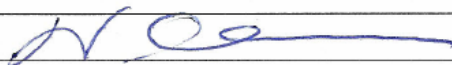
Professor (a) Doutor (a) Heloísa Helena de Araújo Ferreira



Professor (a) Doutor (a) Gil Benard



Professor (a) Doutor (a) Nicola Amanda Conran Zorzetto



Professor (a) Doutor (a) Maria Letícia Cintra



Professor (a) Doutor (a) Maria Heloísa de Souza Lima Blotta



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/07/2012

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Célio e Vânia, não só por terem acreditado em mim, mas pelo apoio e incentivo durante todo esse período; e ao meu marido, Giovanni pelo companheirismo, compreensão, paciência e exemplo de dedicação ao ensino e pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, pela força concedida por mais essa etapa na vida.

Aos meus pais, Célio Antônio de Oliveira Braga e Vânia Lúcia Gambogi Braga pelo apoio, carinho, pelas orações, por sempre me incentivarem em meus sonhos e acreditarem em mim, pois vocês são a base da minha vida e os meus ídolos.

Ao meu marido, Giovanni Wilson Amarante, sempre companheiro, amigo paciente, por me incentivar em cada momento, por todo apoio e carinho infinito, por estar sempre ao meu lado, enfim, não há palavras para explicar o quanto você é importante em minha vida.

Aos meus irmãos, meu sogro, minha sogra, cunhados e cunhadas pela paciência e incentivo neste percurso.

À minha orientadora Maria Heloísa de Souza Lima Blotta pela orientação, paciência, e principalmente pela confiança. Essa fase da minha vida foi um aprendizado eterno.

À Wanda pela amizade e pela carta de recomendação, viabilizando o início deste doutorado.

Ao Dr Ricardo Mendes Pereira por avisar sobre os pacientes, pois sem a sua ajuda este trabalho não seria possível.

À Dra Carla Penteado e sua aluna Flávia Palis que abriram as portas do seu laboratório e me auxiliaram no início tão difícil deste projeto.

Ao Ronei, por me mostrar o quão difícil é trabalhar com os eosinófilos.

Às minhas grandes e espero que eternas amigas Eliane, Marcela e Xinaida por me auxiliarem em tudo que precisei. Vocês fazem parte deste momento tão importante em minha vida.

Aos meus colegas de laboratório Carol, Fábio, Larissa, Lisandra, Lívia, Munir, Rômulo pelos momentos de descontração e pela convivência.

À Rosiane pela realização das reações de imuno-histoquímica dessa tese.

Aos professores da Banca Examinadora Dra Heloísa Helena A. Ferreira, Dr Gil Benard, Dra Nicola Conran Zorzetto e Dra Maria Letícia Cintra pela leitura da tese, sugestões e correções.

Agradeço à Dra Ângela Maria Victoriano de Campos Soares da Unesp de Botucatu que cedeu os fungos Pb18 e Pb265, pois sem eles não haveria possibilidade de realizar este trabalho. E à Luzia e ao Edson (funcionários da Microbiologia) que cultivaram os fungos até o momento do uso.

Ao Dr Anibal Vercesi e à Ana Leda por permitirem que eu pudesse utilizar o citômetro de fluxo do laboratório sempre que necessário.

À FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado e suporte financeiro.

À todos que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho o meu MUITO OBRIGADA!!!

LISTA DE ABREVIATURAS

- BSA	Soroalbumina Bovina
- CCL5	RANTES (<i>regulated upon activation, Normal T-cell Expressed and Secreted</i>)
- CCL11	eotaxina-1
- CXCL9	MIG (<i>monokine induced by IFN-γ</i>)
- CXCL10	IP-10 (<i>IFN-γ induced protein 10</i>)
- cDNA	Ácido desoxiribonucléico complementar
- DAB	3,3 diaminobenzidina
- DEPC	Dietilpirocarbonato
- CFU	Colony Forming Unit
- DHR	Dihidrorodamina- 123
- ECP	Proteína Catiônica do eosinófilo
- EDN	Neurotoxina derivada dos eosinófilos
- EPO	Peroxidase do eosinófilo
- ELISA	ensaio imunoenzimático
- FA	Forma Adulta
- FJ	Forma Juvenil
- GM-CSF	Fator estimulador da formação de colônias de granulócitos e monócitos
- H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
- HLEC	Células Endoteliais Pulmonares Humanas
- HTT	Hipersensibilidade do tipo tardio

- IFN	Interferon
- IDO	indoleamina 2,3-dioxigenase
- Ig	Imunoglobulina
- ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
- IL	Interleucina
- IMF	Intensidade Média de Fluorescência
- iNOS2	Óxido nítrico sintase induzida
- LFA-1	Antígeno associado à função de linfócitos-1 (CD11a/CD18)
- LPA	Poliacrilamida Linear
- mAb	Anticorpo Monoclonal
- Mac-1	Integrina alpha M (CD11b/CD18)
- MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
- NO	Óxido nítrico
- OPD	Orto-fenilenodiamina
- Pb18	cepa de alta virulência do fungo <i>P. brasiliensis</i>
- Pb265	cepa de baixa virulência do fungo <i>P. brasiliensis</i>
- PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
- PCM	Paracoccidioidomicose
- PI	Paracoccidioidomicose-Infecção
- qRT-PCR	Reação de cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa Quantitativa (PCR em tempo real)
- RNA_m	Ácido ribonucleico (RNA) mensageiro
- RIOs	Reativos Intermediários de Oxigênio
- SBF	Soro Bovino Fetal

- **TGF** Fator de Transformação de Crescimento
- **Th** T auxiliar
- **TLR** Receptores do tipo Toll
- **TNF** Fator de Necrose Tumoral
- **VLA-4** Integrina $\alpha 4\beta 1$ (CD49d)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Concentração sérica de RANTES, eotaxina, CXCL9, CXCL10, MBP, ECP, EPO e EDN em pacientes com a forma juvenil da PCM e controles.....	80
Figura 2 – Detecção de MBP em biópsias de linfonodos e fígado de pacientes com PCM por imuno-histoquímica.....	87
Figura 3 – Detecção de RANTES em biópsias de linfonodos e fígado de pacientes com PCM por imuno-histoquímica.....	88
Figura 4 – Detecção de eotaxina em biópsias de linfonodos e fígado de pacientes com PCM por imuno-histoquímica.....	89
Figura 5 – Porcentagem de migração dos eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM e indivíduos saudáveis frente a diferentes estímulos.	91
Figura 6 – Acompanhamento da resposta quimiotática dos eosinófilos do paciente AMRM frente a diferentes estímulos.....	94
Figura 7 - Acompanhamento da resposta quimiotática dos eosinófilos do paciente LDS frente a diferentes estímulos.....	95
Figura 8 – Acompanhamento da resposta quimiotática dos eosinófilos do paciente WCPS frente a diferentes estímulos.....	96
Figura 9 – Acompanhamento da resposta quimiotática dos eosinófilos do paciente CSS frente a diferentes estímulos.....	97
Figura 10 – Número de eosinófilos pacientes com a forma juvenil da PCM e indivíduos saudáveis aderidos às células endoteliais pulmonares.....	99
Figura 11 – Produção de peróxido de hidrogênio por eosinófilos de pacientes com a FJ da PCM e controles não estimulados, estimulados com PMA ou com leveduras Pb18 ou Pb265.....	101
Figura 12 – Produção de peróxido de hidrogênio por eosinófilos de pacientes com a FJ da PCM e controles não estimulados, estimulados com leveduras Pb18 ou Pb265 e incubados com IL-5	101
Figura 13 – Número de CFUs/mL de doadores sadios e IL-5 em diferentes	

concentrações.....	103
Figura 14 – Número de CFUs/mL de pacientes com a forma juvenil da PCM e IL-5 em diferentes concentrações.....	104
Figura 15 – Expressão relativa do RNAm para IL-1 β , IL-2 e IL-4 em eosinófilos do sangue periférico de pacientes com PCM e indivíduos saudáveis.....	106
Figura 16 – Expressão relativa do RNAm para CXCL8 e CCL5 em eosinófilos do sangue periférico de pacientes com PCM e indivíduos saudáveis.....	107
Figura 17 – Expressão relativa do RNAm para ECP, EDN, MBP e EPO em eosinófilos do sangue periférico de pacientes com PCM e indivíduos saudáveis.....	108
Figura 18 – Detecção de IL-25 em biópsias de linfonodos e fígados de pacientes com a forma juvenil da PCM por imuno-histoquímica.....	110
Figura 19 – Detecção de IDO em biópsias de linfonodos e fígados de pacientes com a forma juvenil da PCM por imuno-histoquímica.....	111
Figura 20 – Frequência de eosinófilos positivos para as moléculas de coestimulatória CD80 e CD86 pacientes com PCM e controles.....	113
Figura 21 – Frequência de eosinófilos positivos para as moléculas de reconhecimento antigênico MHC de classe II, TLR-2 e TLR-4 em pacientes com PCM e controles.....	114
Figura 22 - Frequência de eosinófilos positivos para os receptores de IgE (CD23 e Fc ϵ R1 α) em pacientes com PCM e controles.....	115
Figura 23 – Frequência de eosinófilos positivos para moléculas de adesão LFA-1 (CD11a/CD18) e ICAM-1 (CD54) em pacientes com PCM e controles.....	116
Figura 24 – Intensidade média de fluorescência (IMF) de CD11b e CD49d de eosinófilos de pacientes em pacientes com PCM e controles.....	117
Figura 25 - Frequência de eosinófilos positivos para o receptor de eotaxina (CCR3) e o marcador de ativação celular (CD69) em pacientes com PCM e controles.....	118

Figura 26 - Frequência de eosinófilos positivos para as moléculas coestimulatórias CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) em pacientes com a forma juvenil da PCM antes e durante o tratamento antifúngico.....	120
Figura 27 – Frequência de eosinófilos positivos para as moléculas de reconhecimento antigênico MHC de classe II, TLR-2 e TLR- em pacientes com a forma juvenil da PCM antes e durante o tratamento antifúngico.....	121
Figura 28 – Frequência de eosinófilos positivos para os receptores de IgE (CD23 e FcεRIα) em pacientes com a forma juvenil da PCM antes e durante o tratamento antifúngico.....	122
Figura 29 – Frequência de eosinófilos positivos para moléculas de adesão LFA-1 (CD11a/CD18) e ICAM-1 (CD54) em pacientes com a forma juvenil da PCM antes e durante o tratamento antifúngico.....	123
Figura 30 – Intensidade média de fluorescência (IMF) de CD11b e CD49d em pacientes com a forma juvenil da PCM antes e durante o tratamento antifúngico.....	124
Figura 31 – Frequência de eosinófilos positivos para o receptor de eotaxina (CCR3) e o marcador de ativação celular (CD69) em pacientes com a forma juvenil da PCM antes e durante o tratamento antifúngico.....	125
Figura 32 – “Dot-plots” representativos da separação de eosinófilos pelo gradiente de densidade de Percoll e separação com beads.....	160
Figura 33 – Controle negativo da imuno-histoquímica das biópsias de linfonodo (A) e fígado (B) de pacientes com a forma juvenil da PCM (400X).....	161
Figura 34 – Gráficos de representativos da análise da intensidade média de fluorescência da diidrorodamina-1,2,3 para a determinação da produção de peóxido de hidrogênio pelos eosinófilos.....	162
Figura 35 – Número de CFUs/mL de doadores sadios e pacientes com a forma juvenil da PCM em diferentes proporções entre eosinófilos e leveduras.....	163
Figura 36 – Gráficos representativos da padronização da reação de qRT-PCR.....	166

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Dados dos pacientes incluídos no estudo.....	74
Tabela II – Número de eosinófilos, concentração sérica de proteína C reativa (PCR) e de anticorpos anti- <i>P. brasiliensis</i> em pacientes com PCM antes (T0) e após diferentes tempos (T1m – T14m) de tratamento antifúngico.....	77
Tabela III –. Concentrações séricas das proteínas de grânulos de eosinófilos em pacientes com a FJ da PCM antes e durante o tratamento antifúngico.....	82
Tabela IV – Concentrações de eotaxina, CXCL9 e CXCL10 no soro de pacientes com PCM antes e durante o tratamento antifúngico.....	84
Tabela V – Anticorpos utilizados na reação de Imuno-histoquímica.....	161
Tabela VI –. Sequências dos “primers” utilizados na reação de qRT-PCR...	164

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	35
OBJETIVOS	
Objetivo Geral.....	51
Objetivos específicos.....	51
MATERIAL E METODOS	
1. Delineamento experimental.....	55
2. Casuística.....	57
3. Cultivo das células leveduriformes de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (cepas Pb18 e Pb265).....	57
4. Isolamento dos eosinófilos.....	58
5. Dosagem de proteínas específicas de grânulos dos eosinófilos (MBP, ECP, EPO e EDN), RANTES, eotaxina, MIG/CXCL9 e IP-10/CXCL10 no soro de pacientes e controles.....	59
6. Imuno-histoquímica.....	60
7. Condições da cultura.....	60
7.1. Quimiotaxia.....	61
7.2. Avaliação da capacidade de adesão de eosinófilos a células endoteliais pulmonares humanas (HLEC).....	62
7.3. Determinação da produção de H ₂ O ₂	63
7.4. Avaliação da atividade fungicida direta dos eosinófilos sobre as leveduras Pb18 e Pb265 de <i>P. brasiliensis</i>	64
7.5. Avaliação da expressão de genes associados a atividade de eosinófilos	
Extração de RNA.....	65
Síntese de cDNA.....	66
qRT-PCR	66
7.6. Caracterização dos marcadores de superfície de eosinófilos por citometria de fluxo.....	68
8. Análise estatística.....	69
RESULTADOS	
1. Descrição dos pacientes incluídos no estudo.....	73
2. Variação do número de eosinófilos, concentração de Proteína C reativa e título de anticorpos em pacientes com a forma juvenil da PCM ao longo do tratamento antifúngico.....	75

3. Concentrações séricas de proteínas de grânulos de eosinófilos (MBP, ECP, EPO e EDN), CCL5, CCL11, CXCL9 e CXCL10 nos pacientes com a forma juvenil da PCM (antes e após tratamento antifúngico) e doadores sadios (controles).....	79
4. Expressão de MBP, RANTES e eotaxina em linfonodos e fígado de pacientes com a forma juvenil da PCM	86
5. Resposta quimiotática dos eosinófilos do sangue periférico dos pacientes com a FJ da PCM (antes e durante tratamento antifúngico) e doadores sadios (controles).....	90
6. Adesão dos eosinófilos do sangue periférico de pacientes e indivíduos saudáveis às células endoteliais pulmonares humanas.....	98
7. Produção de peróxido de hidrogênio por eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM e doadores sadios (controles).....	100
8. Avaliação da atividade fungicida direta dos eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM e de indivíduos saudáveis sobre leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	102
9. Expressão gênica de IL-1 β , IL-2, IL-4, CXCL8, CCL5, MBP, EPO, ECP e EDN por eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM e controles.....	105
10. Expressão de IL-25 e IDO em linfonodos e fígado de pacientes com a forma juvenil da PCM.....	109
11. Expressão de marcadores de superfície em eosinófilos do sangue periférico de pacientes e indivíduos saudáveis.....	112
12. Expressão de marcadores de superfície em eosinófilos do sangue periférico de pacientes durante o tratamento antifúngico.....	119
DISCUSSÃO.....	127
CONCLUSÕES.....	139
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143
APÊNDICE	
1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.....	157
2. Análise da separação de eosinófilos pelo gradiente de densidade de Percoll® e separação imunomagnética.....	159
3. Anticorpos e controle negativo da reação de Imuno-histoquímica.....	161
4. Análise da produção de peróxido de hidrogênio por eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM e doadores sadios.....	162

5. Atividade fungicida direta de eosinófilos em diferentes proporções com as células fúngicas.....	163
6. Tabela VI: Sequências dos “primers” utilizados na reação de qRT-PCR.....	164
7. Determinação da eficiência e especificidade de amplificação dos primers utilizados na técnica de qRT-PCR.....	165

RESUMO

Pacientes com a forma juvenil da paracoccidioidomicose (PCM) apresentam resposta imune celular deprimida, evidenciada por teste de hipersensibilidade do tipo tardio negativo e proliferação linfocitária deficiente a antígenos do fungo e pela produção de citocinas do tipo TH2 como IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β . Além disso, um aspecto comum desta forma da doença é o número elevado de eosinófilos no sangue periférico, que retorna a valores normais após o tratamento antifúngico. O papel dos eosinófilos na PCM nunca foi investigado. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade funcional de eosinófilos de 15 pacientes com a forma juvenil da PCM. Para tanto eosinófilos isolados do sangue periférico de pacientes (antes e durante o tratamento antifúngico) e de doadores sadios (controles) foram avaliados quanto a: capacidade quimiotática em resposta ao RANTES, eotaxina e IL-5; capacidade de adesão a células endoteliais pulmonares; expressão de receptores de reconhecimento e apresentação de antígenos (CD80, CD86, MHC de classe II, TLR-2 e TLR-4), de moléculas de adesão (CD11a, CD11b, CD49d e CD54), de receptores de IgE (CD23 e FC ϵ RI α), marcadores de ativação (CD69) e do receptor CCR3; atividade fungicida direta contra leveduras de *P. brasiliensis* e expressão gênica de citocinas, quimiocinas e proteínas de grânulos. Também foi realizada a dosagem dos níveis séricos de constituintes dos grânulos citotóxicos (MBP, EPO, ECP e EDN) e das quimiocinas CCL5, eotaxina, CXCL9, CXCL10 em pacientes antes e durante o tratamento antifúngico e controles. Biópsias de linfonodos e fígados dos pacientes foram analisadas quanto a expressão de RANTES, eotaxina, MBP, IL-25 e IDO. Os resultados mostraram eosinofilia periférica em 86,7% dos casos, altos títulos de anticorpos anti-*P. brasiliensis* e concentração sérica elevada de proteína C reativa. A resposta quimiotática à eotaxina, a adesão a HLECs e a expressão do RNAm para IL-1 β , IL-2, IL-4, CCL5 e CXCL8 foi maior nos eosinófilos de pacientes comparados aos controles. Eosinófilos de pacientes, assim como de controles, foram capazes de matar leveduras de *P. brasiliensis*. Maior frequência de eosinófilos CD69⁺ e TLR2⁺ e menor frequência de eosinófilos CD80⁺, MHC de classe II⁺, TLR-4⁺, CD23⁺ e CD11a⁺ foi observada em pacientes comparado aos controles. O acompanhamento dos pacientes durante o tratamento antifúngico mostrou a

redução número de eosinófilos do sangue periférico, da concentração sérica de proteína C reativa, dos títulos de anticorpos anti-*P.brasiliensis*, dos níveis séricos de proteínas citotóxicas e quimiocinas, além de aumento da capacidade migratória em resposta à eotaxina. Adicionalmente, eosinófilos de pacientes apresentam redução da expressão de receptores de reconhecimento e apresentação de antígenos, de ativação, de moléculas de adesão, do receptor de IgE CD23 e do receptor CCR3 durante o tratamento antifúngico. Nas lesões causadas pelo fungo em linfonodos e fígado foi detectada marcação positiva para MBP, eotaxina, RANTES, IL-25 e IDO. Em conclusão, o presente trabalho permitiu demonstrar que os eosinófilos dos pacientes com a forma juvenil da PCM encontram-se ativados (alta expressão do CD69) e poderiam estar contribuindo para a intensa resposta inflamatória que caracteriza a fase inicial da forma juvenil da PCM e prejudica a resposta de eliminação do fungo. Após o tratamento antifúngico, observou-se uma diminuição dos parâmetros analisados, exceto a capacidade quimiotática dos eosinófilos que aumentou devido, provavelmente, a redução de inibidores da quimiotaxia como o CXCL9 e CXCL10.

ABSTRACT

Patients with juvenile form of paracoccidioidomycosis (PCM) have a depressed cellular immune response as shown by negative delayed-type hypersensitivity, suppressed lymphocyte proliferation to *P. brasiliensis* antigens, and production of TH2 cytokines such as IL-4, IL-5, IL-10 and TGF- β . Furthermore, a common feature of this disease is the large number of eosinophils in the peripheral blood that returns to normal values after antifungal treatment. The role of eosinophils in PCM has never been investigated. This study aimed to evaluate the phenotypic and functional characteristics of eosinophils of 15 patients with the juvenile form of PCM. Eosinophils of patients isolated from peripheral blood (before and during the antifungal treatment) and of healthy donors (controls) were evaluated for: chemotactic response to RANTES, eotaxin and IL-5; adhesion to human lung endothelial cells (HLECs); expression of antigen recognition and presentation molecules (CD80, CD86, MHC class II, TLR2 and TLR-4), adhesion molecules (CD11a, CD11b, CD49d and CD54), IgE receptors (CD23 and FC ϵ RI α), activation marker (CD69) and CCR3; direct fungicidal activity against *P. brasiliensis* yeast cells and gene expression of cytokines, chemokines and protein granules. We also assessed serum levels of granules cytotoxic molecules (MBP, EPO, ECP and EDN) and chemokines (CCL5, eotaxin, CXCL9, CXCL10) in patients before and during the antifungal treatment and controls. Lymph nodes and liver biopsies of patients were stained for RANTES, eotaxin, MBP, IL-25 and IDO. The results showed peripheral eosinophilia in 86.7% of cases, high titers of antibodies to *P. brasiliensis* and high concentration of C-Reactive Protein. The chemotactic response to eotaxin, adhesion to HLECs and expression of mRNA for IL-1 β , IL-2, IL-4, CCL5 and CXCL8 was higher in eosinophils of patients than in controls. Eosinophils of patients as well as of controls were able to kill *P. brasiliensis* yeast cells. A higher frequency of eosinophil CD69⁺ and TLR2⁺ and lower frequency of eosinophil CD80⁺, MHC class-II⁺, TLR-4⁺, CD23⁺ and CD11a⁺ was found in patients compared to controls. Patient's follow-up showed a reduction in the number of eosinophils in peripheral blood, serum concentration of C-Reactive protein, anti-*P. brasiliensis* antibodies, serum levels of cytotoxic proteins and chemokines, in addition to increased migration capacity. Moreover, eosinophils of

patients exhibited reduced expression CD80, MHC class-II, TLR-4, CD23, CD11a, CD11b, CD23, CD69 and CCR3 during the antifungal treatment. Immunohistochemistry staining showed strong expression of MBP, eotaxin, RANTES, IL-25 and IDO in liver and lymph nodes biopsies from PCM patients. In conclusion, this study demonstrated that eosinophils are strongly activated (high CD69 expression) and could contribute to the intense inflammatory response that characterize the initial phase of juvenile form of PCM response and impairs the elimination of the fungus. After antifungal treatment, there was a decrease of all parameters except the chemotactic ability of eosinophils which increased, probably due to reduction of inhibitors of chemotaxis such as CXCL9 and CXCL10.

INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica de evolução crônica causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, que exibe dimorfismo térmico e que na forma miceliana, à temperatura ambiente (25°C), produz colônias de crescimento lento que habitam o solo de áreas endêmicas (1-3). À microscopia, a forma miceliana apresenta-se como uma hifa fina septada, sendo os conídios a forma infectante do fungo. Sob temperatura de 35-37°C o *P. brasiliensis* assume a forma de levedura, que corresponde a forma parasitária no tecido do hospedeiro (2).

A PCM representa um importante problema de saúde devido ao seu potencial incapacitante, além de provocar mortes prematuras. A micose acomete principalmente trabalhadores rurais, agricultores, operários da construção civil, sendo mais frequente em homens do que em mulheres. A menor incidência em mulheres é explicada pelo efeito protetor do hormônio feminino 17- β -estradiol, que bloqueia a transformação de conídios em levedura, forma capaz de causar a doença (4-6).

A infecção pelo *P. brasiliensis* geralmente ocorre nas primeiras duas décadas de vida, mas o indivíduo pode desenvolver a doença anos mais tarde, na dependência de fatores que comprometem a resposta imune como tabagismo, etilismo e desnutrição (7).

A PCM é endêmica na América Latina, onde estima-se que há cerca de 10 milhões de pessoas estão infectadas e 2% vão desenvolver a doença (8). A maioria dos países latino-americanos relata a ocorrência da doença, como o Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador e Argentina. No entanto a maior incidência ocorre no Brasil, sendo São Paulo o estado com o maior número de casos diagnosticados (9). Nas áreas de maior endemicidade a incidência anual atinge 3 casos/100.000 habitantes (2,7,10). A PCM é considerada a terceira causa de morte por doença infecciosa crônica, resultando em uma taxa de mortalidade de 1,65 casos/1.000.000 de habitantes (11).

Inúmeras evidências indicam que o principal meio de infecção é a via inalatória, com subsequente desenvolvimento de foco e complexo primário

pulmonar. Após a inalação os conídios e fragmentos micelianos alcançam os bronquíolos terminais e alvéolos pulmonares, onde se transformam em células leveduriformes causando infecção local, que pode disseminar-se para os tecidos via linfática e/ou hematogênica. O complexo pulmonar pode ser eliminado, evoluir para doença progressiva ou para um estado de equilíbrio entre o agente e o hospedeiro, denominado foco quiescente (12).

A PCM é classificada em duas formas clínicas principais: a forma aguda ou juvenil (FJ) que afeta, principalmente, crianças e adultos jovens de ambos os sexos. Em geral essa forma clínica se desenvolve a partir de uma lesão primária pulmonar não detectada que progride rapidamente com disseminação via linfática e hematogênica para órgãos do sistema fagocítico-mononuclear (linfonodos, baço, fígado e medula óssea). A forma crônica ou adulta (FA) (unifocal ou multifocal), com evolução de caráter crônico, representa mais de 90% dos casos da PCM e ocorre em indivíduos com idade superior a 30 anos. Essa forma clínica desenvolve-se a partir do complexo primário pulmonar ou da reativação de foco quiescente pulmonar ou metastático. Na forma unifocal (localizada), apenas um órgão ou sistema é afetado e o pulmão é o órgão mais frequentemente atingido, seguido de lesões ulceradas de pele e mucosas (7,9,13).

A resposta imune do hospedeiro tem grande influência e determina as diferentes apresentações clínicas da PCM. Em áreas endêmicas o índice de infecção pode chegar a 70% da população. No entanto o número de casos de doença é muito inferior, demonstrando a importância do equilíbrio parasito-hospedeiro (9). Indivíduos que residem ou trabalham em áreas endêmicas, entram em contato com o fungo, mas não desenvolvem a doença constituem um grupo denominado PCM-infecção, e apresentam uma vigorosa resposta imune celular, que pode ser evidenciada pelo teste cutâneo de hipersensibilidade tardia (HTT) positivo e intensa resposta linfoproliferativa a antígenos do fungo, além da produção de citocinas ativadoras de macrófagos como IFN- γ e TNF- α (14,15). Este perfil caracteriza uma resposta imune do tipo Th1 e está associada à resistência a doença.

Na FJ da PCM há predominância da resposta imune do tipo Th2 caracterizada pela ativação e diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos com produção de anticorpos das classes IgG4, IgE e IgA, resposta anérgica no teste de HTT e baixa resposta linfoproliferativa a antígenos do fungo (10,14,16,17). Células mononucleares do sangue periférico de pacientes com a FJ da doença produzem preferencialmente citocinas do tipo Th2 como IL-4, IL-5 e IL-10 (14) e outras citocinas inibitórias como o TGF- β são encontradas em concentrações elevadas no soro (17). Outro achado comum em pacientes com a FJ da PCM é a eosinofilia periférica, que caracteriza a fase inicial da doença (18,19).

Os pacientes com a forma adulta da PCM apresentam um padrão intermediário entre a resposta Th1 e Th2 com produção de anticorpos da classe IgG1, resposta linfoproliferativa e teste cutâneo de HTT variáveis e de maneira geral, uma produção mista de citocinas como IFN- γ , TNF- β e IL-10 (14,17). Na forma adulta com apresentação mais localizada e evolução mais branda a resposta imune aproxima-se mais daquela exibida pelos indivíduos com PCM-infecção, enquanto que nas formas mais graves e disseminadas aproxima-se daquela presente nos pacientes com a forma aguda da doença.

Ainda não se sabe exatamente quais os fatores que influenciam a polarização da resposta adaptativa na PCM, mas, assim como em outras patologias, os eventos que ocorrem no início da infecção devem ter papel preponderante (20-22).

A resposta imune inata vem sendo cada vez mais estudada e valorizada, uma vez que é fundamental na fase inicial da infecção e determina o tipo de resposta adaptativa, controlando a diferenciação das células efectoras. Os eosinófilos são componentes da resposta imune inata, estão envolvidos na proteção do hospedeiro contra parasitos, bactérias, vírus, fungos e doenças alérgicas, participam da iniciação e propagação da resposta inflamatória, bem como da modulação da resposta imune inata e adaptativa (23-25).

Pacientes com a forma aguda ou juvenil da PCM, principalmente crianças, apresentam número elevado de eosinófilos no sangue periférico que decresce

durante o tratamento antifúngico, associando a sua presença à atividade e gravidade da doença (18,26-29).

Relato de casos de PCM descreveram intensa eosinofilia associada à hipercalcemia e alterações da função hepática e renal em crianças de 2 e 6 anos de idade (29,30).

Em estudo clínico com 63 crianças menores de 15 anos com PCM, foi constatada eosinofilia periférica em 75,5%. Neste grupo foi observado que seis pacientes morreram devido à disseminação do fungo, mesmo após o tratamento. Nos pacientes que responderam ao tratamento, o seguimento laboratorial mostrou uma diminuição significativa no número de eosinófilos entre o 1º e 6º mês após a admissão, sendo este parâmetro considerado muito útil para avaliação da eficácia terapêutica (18).

Outro estudo com 38 crianças até 14 anos de idade tratados por 24-30 meses com anfotericina B e/ou sulfadiazina ou sulfametoxazol-trimetoprima ou cetoconazol mostrou que a eosinofilia apresentada por esses pacientes retorna a valores normais por volta do 3º mês de tratamento. Neste estudo os autores observaram ainda que os pacientes com o maior número de eosinófilos apresentavam envolvimento de múltiplos órgãos pela micose, incluindo ossos com eosinofilia na medula óssea e em um dos casos com achado do fungo no líquido sinovial da articulação afetada (19).

A intensa eosinofilia na PCM não ocorre exclusivamente em pacientes jovens, mas é relacionado à forma aguda da doença ou infecção primária com *P. brasiliensis*. Martinez e Moya (31) relataram o caso de um paciente do sexo masculino de 28 anos de idade com infecção primária com *P. brasiliensis*, apresentando linfadenomegalia hilar e infiltrado pulmonar apical bilateral associado com hipereosinofilia.

Estes achados encontram em paralelo na PCM experimental, visto que camundongos suscetíveis à infecção pelo *P. brasiliensis* apresentam eosinofilia medular e esplênica, concomitante com a secreção de altos níveis de IL-5 (32).

Tanto na doença humana, como na infecção experimental pelo *P. brasiliensis*, a presença de um número elevado de eosinófilos é associada à gravidade, disseminação do fungo e maior suscetibilidade do hospedeiro. Entretanto, pouco se sabe sobre a participação desta população celular na patogênese da PCM.

Granulócitos do sistema imune inato e conhecidos por sua função efetora citotóxica, os eosinófilos são recrutados da circulação para os focos inflamatórios em resposta a diversos estímulos. A estimulação dessas células pela ligação dos receptores de citocinas, imunoglobulinas e complemento pode levar à secreção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18, IFN- γ e TGF- α/β), quimiocinas (RANTES e eotaxina-1) e mediadores lipídicos (fator ativador de plaquetas e leucotrieno C4) (33,34). Essas moléculas têm efeitos pró-inflamatórios, incluindo a regulação das moléculas de adesão, modulação do tráfego celular, regulação da permeabilidade vascular, secreção de muco e constrição da musculatura lisa (25). A degranulação com liberação de moléculas citotóxicas pode rapidamente afetar o microambiente influenciando o recrutamento celular, reparo e remodelamento tecidual, homeostase, exacerbação da resposta inflamatória e resposta direta contra o patógeno (35). Além disso, os eosinófilos podem iniciar uma resposta imune antígeno-específica agindo como células apresentadoras de antígenos (APCs) (36).

Os grânulos protéicos citotóxicos e altamente básicos fazem parte do arsenal de moléculas que são liberadas após a ativação dos eosinófilos, promovendo dano tecidual (37). Um desses grânulos é a proteína básica principal (MBP) com efeito tóxico para células tumorais e outras células de mamíferos devido a sua capacidade de romper a camada lipídica, carregando negativamente a membrana celular por seu caráter altamente básico, aumentando a permeabilidade celular (38). A MBP também atua sobre parasitos (39) e é capaz de ativar basófilos, mastócitos e plaquetas (40). Estudos histológicos mostraram a presença de eosinófilos e MBP próximos a células fúngicas em granulomas de pacientes com PCM (41).

Outro grânulo eosinofílico, a neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) ou RNase 2, é um membro da superfamília da RNase A, com propriedades anti-virais e quimiotáticas. A EDN pode atuar como alarmina, ativando e induzindo a diferenciação de células dendríticas (42,43). Foi demonstrado que a EDN produzida por eosinófilos de camundongos imunizados com OVA é capaz de ativar células dendríticas promovendo a resposta Th2. Desta forma, além de interagir com o TLR-2 das células dendríticas ativando NF- κ B, a EDN atua como um ligante endógeno (43). Fungos como a *Alternaria alternata* e *Penicillium notatum* promovem ativação de eosinófilos com consequente liberação de EDN, cuja concentração relaciona-se ao número de células fúngicas (44).

A proteína catiônica de eosinófilos (ECP ou RNase 3) também possui atividade RNase e propriedade antiviral, antihelmíntica e antitumoral (45-49). Interessante destacar que a atividade RNase da EDN é 100 vezes mais potente do que a da ECP (23).

A peroxidase eosinofílica (EPO) é um membro da grande família de peroxidases de mamíferos, com atividade microbicida contra bactérias, vírus, fungos e helmintos. A EPO é o componente central na geração de espécies reativas de oxigênio por eosinófilos ativados (50) e desta forma poderia participar da defesa contra o *P. brasiliensis*, por meio da produção de peróxido de hidrogênio.

Os eosinófilos são capazes de modular a resposta imune por meio da produção de IL-4, IL-6, IL-10, além de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e quimiocinas como MIP-1 α (CCL3) e RANTES (CCL5), sugerindo seu potencial envolvimento em diversas respostas biológicas como a ativação de células imunes residentes e infiltrantes. Além de citocinas com ação autócrina como a IL-3 e o GM-CSF, os eosinófilos produzem mediadores envolvidos no remodelamento de tecidos como o TGF- β e TGF- β 1 (51), fatores profibróticos e angiogênicos como a osteopontina e o VEGF, além de metaloproteinases. As citocinas IL-3, IL-5 e GM-CSF são particularmente importantes na regulação do desenvolvimento dos eosinófilos. Dentre essas, a IL-5 é a mais específica, sendo responsável pela

regulação da proliferação, diferenciação, ativação e sobrevivência dos eosinófilos, além de estimular a sua liberação da medula óssea para a circulação periférica ou para os sítios inflamatórios após exposição ao alérgeno (52).

Os eosinófilos também produzem IL-25 (IL-17E), citocina indutora da resposta Th2. Uma elevada expressão de IL-25 e de seu receptor IL-25R (IL-17RB) foi observada em tecidos de pacientes com asma crônica e dermatite atópica, sugerindo um importante papel para esse mediador na resposta inflamatória local (53). Como na FJ da PCM ocorre uma predominância da resposta Th2 associada à eosinofilia periférica, a produção de IL-25 poderia ter uma participação na promoção da resposta inflamatória detectada tanto sistemicamente (54), como em tecidos alvos (55).

O estudo do tráfego dos eosinófilos do sangue para os sítios de infecção é de considerável importância, principalmente em doenças nas quais a presença de um número elevado dessas células é uma característica marcante, como no caso da forma juvenil da PCM. O tráfego de eosinófilos para sítios inflamatórios envolve uma série de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13), moléculas de adesão (integrinas β_1 , β_2 e β_7) e quimiocinas (RANTES e as eotaxinas) (25,56).

Os eosinófilos expressam numerosas moléculas de adesão como as integrinas, incluindo $\alpha_4\beta_7$, a família de moléculas CD18 (β_2 -integrinas) e o VLA-4 (β_1 -integrina). A família de moléculas CD18 inclui o LFA-1 e Mac-1 que interagem com células endoteliais através da molécula de adesão intercelular (ICAM-1). VLA-4 interage com o endotélio vascular através da molécula de adesão celular (VCAM-1) e com a fibronectina. O recrutamento de leucócitos para os tecidos é mediado por interações entre moléculas de adesão expressas na superfície de células endoteliais vasculares ativadas e seus ligantes em células circulantes que induzem uma resposta direta dos leucócitos aos fatores quimiotáticos (57).

A migração da eosinófilos através do endotélio vascular é um processo constituído de várias etapas como o rolamento, adesão fraca, adesão firme e migração transendotelial. Os processos de rolamento e a adesão fraca são regulados por selectinas e seus ligantes expressos no endotélio. Os eosinófilos

expressam constitutivamente moléculas de L-selectina que se ligam ao CD34 ou MadCam expressos no endotélio, regulando assim, a etapa de rolamento. As P-selectinas e E-selectinas expressas pelos eosinófilos são responsáveis pela sua adesão fraca ao endotélio. As próximas etapas para a migração dos eosinófilos do vaso sanguíneo para o tecido, a adesão firme e a transmigração, são reguladas não somente pelas moléculas de adesão e seus ligantes, mas também pela sinalização promovida pelas quimiocinas e citocinas (58,59).

A interação específica de integrinas presentes na superfície celular dos eosinófilos com os receptores como o VCAM-1, MadCAM-1, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, e fibrinogênio, facilita a sua migração para vários compartimentos do tecido durante a inflamação. Por exemplo, o recrutamento de eosinófilos para o local da inflamação alérgica no pulmão e na pele é regulada por VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$ integrina) presente no eosinófilos por mecanismo VCAM-1 dependente (60,61). As integrinas têm diferentes papéis no tráfego dos eosinófilos durante a inflamação, sendo evidente que o contato das moléculas de adesão com os seus ligantes não só induz a adesão, mas também ativa a expressão de uma série de genes pró-inflamatórios como GM-CSF, que aumenta a sobrevivência dos eosinófilos (25).

Na infecção com o fungo *Alternaria alternata*, os eosinófilos liberam grânulos com proteínas citotóxicas no meio extracelular e na superfície do fungo, matando o fungo de maneira contato-dependente (44). O CD11b é utilizado pelos eosinófilos para reconhecer o β -glucano na superfície do fungo (62) que tem como consequência a liberação dos grânulos proteicos, isso pode acontecer através da ligação direta das integrinas Mac-1 e VLA-4 e seus ligantes na ausência de estímulos adicionais (63,64).

A adesão dos eosinófilos às células endoteliais vasculares leva a sua ativação, com produção de grande quantidade de espécies reativas de oxigênio, principalmente ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (65). Esses produtos são utilizados pelos fagócitos na defesa antimicrobiana, mas também podem causar dano tecidual. O peróxido de hidrogênio pode interagir com EPO e haletos formando um produto extremamente tóxico (66). A quimiocina CXCL10/IP-10 aumenta a capacidade de adesão dos eosinófilos à molécula ICAM-1,

provavelmente modificando as interações entre os eosinófilos e as moléculas de adesão (67). Essa quimiocina também induz a geração de ânion superóxido pelos eosinófilos na presença de ICAM-1. Nagata e colaboradores (68) mostraram que a adesão dos eosinófilos ao VCAM-1 expresso na superfície de células endoteliais também induz a produção de ânion superóxido. O TNF- α também induz a geração de superóxido pelos eosinófilos quando aderidos à fibronectina (69). A adesão dos eosinófilos nos sítios de infecção, acompanhado pela produção de reativos de oxigênio, pode causar dano tecidual.

Únicos leucócitos capazes de promover uma guerra química devido a presença dos seus grânulos tóxicos, os eosinófilos também possuem enzimas que podem causar danos oxidativos. Além dos reativos de oxigênio, outra via para as modificações oxidativas nos tecidos envolve espécies reativas de nitrogênio (70). O óxido nítrico (NO) é uma molécula reguladora e efetora sintetizada a partir da L-arginina pela óxido nítrico sintase (NOS). O NO está implicado na regulação de diferentes funções, incluindo o relaxamento muscular, inibição de plaquetas, neurotransmissão, resposta imune e inflamação (71,72). Del Pozo e colaboradores (73) foram os primeiros pesquisadores a demonstrar que eosinófilos expressam o mRNA para a iNOS. A síntese de NO é controlada pela disponibilidade de L-arginina e iNOS. O NO é um importante modulador do número de eosinófilos, migração, quimiotaxia e sobrevivência (74-76). Os eosinófilos são os principais produtores de oxidantes derivados de óxido nítrico em pacientes com asma severa (70). Na PCM, foi demonstrado que a produção de NO tem efeito fungicida, mas sua ação é dependente da quantidade produzida, podendo ter efeito protetor ou deletério para o hospedeiro (77-79).

As citocinas produzidas pelos eosinófilos são capazes de promover a proliferação, ativação e polarização de células T (33), sendo geralmente associadas com a resposta Th2 (35). Neste tipo de resposta os eosinófilos são recrutados para o sítio de inflamação, onde produzem citocinas inflamatórias, mediadores lipídicos e liberam as proteínas tóxicas dos grânulos. Essas moléculas podem regular a resposta imune, causando dano tecidual e facilitando o reparo tecidual (23).

A indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) é uma enzima intracelular que promove a oxidação do triptofano, aminoácido essencial para proliferação celular e para a síntese de proteínas. O catabolismo do triptofano mediado pela IDO gera uma cascata de metabólitos farmacologicamente ativos conhecidos coletivamente como quinureninas, que estão envolvidos na imunorregulação. Estudos prévios mostraram que as quinureninas exercem efeito imunossupressor por meio da indução da apoptose e inibição da proliferação de células Th1, mas não Th2. Eosinófilos humanos expressam IDO de forma constitutiva, sendo que a sua expressão gênica aumenta após a estimulação com IFN- γ . Sugere-se que a produção de IDO seja um dos mecanismos pelos quais os eosinófilos mantêm a resposta Th2 (80,81). A forma juvenil da PCM humana é caracterizada pela predominância da resposta Th2 e eosinofilia periférica, portanto um papel para esta enzima poderia ser proposto. Na infecção experimental pelo *P. brasiliensis* foi demonstrado que a IDO induz anergia de linfócitos T CD4+ e CD8+, associada a expansão de células Treg e aumento de linfócitos em apoptose (82).

Várias quimiocinas atraem eosinófilos para locais de inflamação como eotaxinas, MCPs e RANTES. Dentre elas, a eotaxina, que promove a migração transendotelial através do receptor CCR3, parece ter uma ação mais específica (83,84). Estudos experimentais mostram que membros da família da eotaxina (quimiocinas CC) como CCL11 (eotaxina-1), CCL24 (eotaxina-2) e CCL26 (eotaxina-3) são produzidos pelas células residentes do tecido e células do infiltrado inflamatório e seletivamente regulam o tráfico de eosinófilos (25,85).

Eosinófilos ativados constituem importante mecanismo de defesa contra helmintos e fungos (23). Moléculas derivadas de patógenos parecem ativar diretamente os eosinófilos, que não expressam receptores fúngicos comuns, mas utilizam a versatilidade do CD11b, uma integrina β 2 para reconhecer e aderir ao principal componente da parede celular do fungo, o β -glucano (23). Outros tipos celulares como neutrófilos e monócitos utilizam a dectina-1 como receptor para a β -glucana, além dos receptores do tipo Toll. (86).

Os eosinófilos são capazes de reconhecer e fagocitar microrganismos e o envolvimento dos receptores do tipo Toll (TLRs) neste processo é bastante controverso. Nagase e colaboradores (87) demonstraram que os eosinófilos expressam constitutivamente o RNAm para TLR1, TLR4, TLR6, TLR7, TLR9 e TLR10, sendo que na presença de IFN- γ ocorre aumento na expressão do RNAm para TLR4, TLR7 e TLR8. Outros autores também verificaram a presença de RNAm para TLR2 e TLR4 em eosinófilos do sangue periférico (88). Por outro lado, Sabroe e colaboradores (89) constataram que eosinófilos do sangue periférico não expressam TLR2 e TLR4, mas somente RNAm para TLR4. A sinalização via TLRs pode modular muitos aspectos da resposta inflamatória (89), através do reconhecimento do patógeno e indução da produção de citocinas pró-inflamatórias (90), como ocorre com os conídios de *Candida albicans* que são reconhecidos pelos TLR2 e TLR4 (91).

As funções de outras células do sistema imune podem ser moduladas pelas citocinas e quimiocinas produzidos por eosinófilos, sugerindo que seu desenvolvimento em diversas respostas biológicas, desde remodelamento de tecido a ativação de células imunes residentes e do infiltrado inflamatório.

Os eosinófilos também contribuem para a regulação da resposta imune inicial por meio da secreção de citocinas imunoregulatórias, modulação de células dendríticas imaturas, inibição da resposta Th1 através da expressão daIDO e ativação de células T naíve através da apresentação direta de antígeno. Sua ação continua posteriormente, envolvendo e regulando células T na interação com o sistema imune adaptativo (35).

Existem poucos dados na literatura referentes à participação dos eosinófilos na infecção humana pelo *P. brasiliensis*. No entanto, indícios como o número elevado destas células no sangue periférico de pacientes com a forma juvenil da PCM, que retorna a valores normais após o tratamento, a relação positiva entre a produção de IL-4, IL-5, IgG4, IgE e gravidade da doença e análises histológicas demonstrando a presença de eosinófilos e MBP próximos às células fúngicas em granulomas de pacientes com PCM apontam para um possível papel dessas

células na patogênese da PCM. Diante disso, mais estudos são necessários para determinar de maneira mais clara o papel dessas células na fisiopatologia da doença, na exacerbação da resposta inflamatória e/ou na regulação da resposta imune adaptativa.

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a capacidade funcional dos eosinófilos do sangue periférico de pacientes com a forma juvenil da PCM antes e durante o tratamento antifúngico.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a concentração sérica de quimiocinas (RANTES, eotaxina, CXCL9, CXCL10) e de proteínas de grânulos de eosinófilos (MBP, EPO, ECP e EDN) em pacientes com a forma juvenil da PCM (antes e durante o tratamento antifúngico) e doadores sadios.
- Avaliar a capacidade quimiotática de eosinófilos isolados de doadores sadios e pacientes com a forma juvenil da PCM em resposta a leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265), antes e depois do tratamento antifúngico.
- Comparar a adesão basal e estimulada (IL-5, RANTES e eotaxina) de eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM e doadores sadios às células endoteliais pulmonares (HLEC)
- Comparar a produção peróxido de hidrogênio por eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM e doadores sadios.
- Avaliar a expressão do RNAm para citocinas e quimiocinas de eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM e doadores sadios em resposta a estimulação com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265).
- Determinar se os eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM e os doadores sadios apresentam capacidade citotóxica direta contra o fungo *P. brasiliensis* das cepas (Pb18 e Pb265).
- Avaliar a expressão de moléculas de adesão (LFA-1, Mac-1, VLA-4 e ICAM-1), moléculas coestimulatórias (CD80 e CD86), receptores de IgE (CD23 e FC ϵ RI α), receptores do tipo Toll (TLR-2 e TLR-4) e moléculas de MHC de classe II em eosinófilos isolados do sangue periférico de doadores sadios e pacientes com a

forma juvenil da PCM em resposta a leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265), antes de depois do tratamento antifúngico.

- Avaliar a expressão de eotaxina, RANTES, MBP, IL-25 e IDO em biópsias de linfonodos e fígado de pacientes com a forma juvenil da PCM.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Delineamento Experimental

Eosinófilos do sangue periférico de 15 pacientes com a forma juvenil PCM antes do tratamento (13 pacientes foram acompanhados durante o tratamento antifúngico) e 11 indivíduos saudáveis (grupo controle) foram isolados utilizando Percoll® e beads magnéticas. Após o isolamento, parte dessas células foram submetidas à marcação de superfície para CD80, CD86, MHC de classe II, TLR-2, TLR-4, CD69, CD23, FcεRIα, CD11a e CD54; à avaliação da capacidade quimiotática frente a estímulos como RANTES, eotaxina e IL-5; à ensaio de adesão a células endoteliais pulmonares com diferentes estímulos (RANTES, eotaxina e IL-5) e à extração de RNA para avaliação da expressão do RNAm para citocinas, quimiocinas e proteínas de grânulos de eosinófilos.

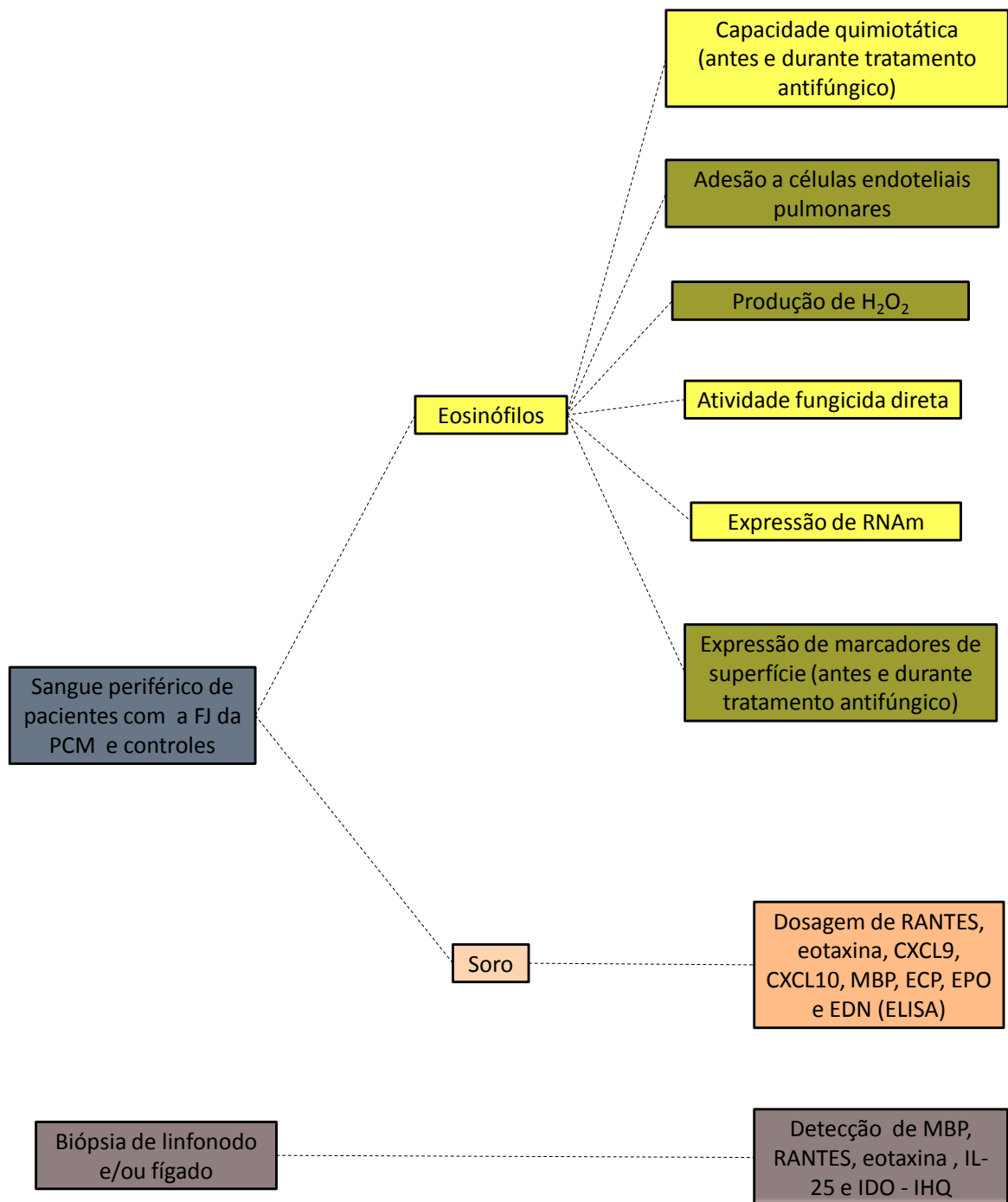
Os mesmos ensaios, além da avaliação da produção de H₂O₂, foram realizados após incubação dos eosinófilos por 4h na presença ou não de leveduras de *P. brasiliensis*. Parte destas culturas de 4h foram plaqueadas em meio BHI para avaliação da atividade fungicida de eosinófilos.

A avaliação da expressão de marcadores de superfície e da atividade quimiotática dos eosinófilos de pacientes também foi realizada em diferentes tempos durante o tratamento antifúngico.

A concentração sérica de quimiocinas (RANTES, eotaxina, CXCL9 e CXCL10) e de proteínas citotóxicas (MBP, ECP, EPO e EDN) foi avaliada antes (pacientes e controles) e durante o tratamento antifúngico.

Biópsias de fígado e linfonodos dos pacientes foram analisadas quanto a expressão de MBP, RANTES, eotaxina, IL-25 e IDO por imuno-histoquímica.

O diagrama abaixo tem a finalidade de esquematizar as etapas do delineamento experimental.



2. Casuística

Foram estudados os eosinófilos do sangue periférico de 15 pacientes com PCM, forma juvenil, selecionados nos ambulatório de Pediatria e de Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas da UNICAMP. O diagnóstico da doença foi estabelecido pelo achado do fungo em exame direto e/ou sorologia (imunodifusão). O grupo controle foi constituído por 11 indivíduos saudáveis com até 35 anos de idade que realizaram tratamento antihelmíntico antes da coleta do sangue. Cada indivíduo ou responsável foi informado sobre o estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), conforme as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (anexo).

Os fatores de exclusão para pacientes e controles foram: presença de asma ou outra doença alérgica, parasitoses helmínticas, uso freqüente ou nas quatro semanas anteriores à coleta de anti-inflamatórios não esteróides, corticóides, 6-mercaptopurina, azatioprina, metotrexato, ciclosporina, talidomida ou infliximab.

3. Cultivo das células leveduriformes de *Paracoccidioides brasiliensis* (cepas Pb18 e Pb265)

Culturas da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* (cepas Pb18 de alta virulência e Pb265 de baixa virulência), foram mantidas em estufa a 36°C em tubos com meio Fava-Netto por 5 dias. Após esse período as células fúngicas foram retiradas, lavadas em PBS estéril, transferidas para tubos 50 mL contendo esferas de vidro de 4 mm de diâmetro e agitadas por 5 minutos. Após a agitação os tubos foram incubados por 30 minutos a 37°C para a deposição dos grumos celulares e 4 mL do sobrenadante foi transferido para outro tubo, a partir do qual o número de células viáveis foi determinado por meio da contagem em hematocítômetro na presença de azul de tripan. Foram utilizadas somente suspensões celulares com viabilidade acima de 85%.

4. Isolamento de eosinófilos

O sangue periférico foi coletado da veia do antebraço sob condições estéreis em tubos à vácuo contendo heparina. Em tubos novos de 50 mL foram adicionados 15 mL de solução isotônica de Percoll (densidade 1,082; pH 7,4; 340mOs/Kg; 4°C): 9,5 mL de Percoll (GE HealthCare - densidade 1,13), 4 mL de H₂O e 1,5 mL de solução de Hanks 10x (1,3M NaCl, 50 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 4 mM Na₂HPO₄ e 100 mM HEPES). O sangue coletado foi diluído 1:1 com PBS/BSA 1% e adicionado sobre a solução de Percoll. Após centrifugação a 1000g por 20 minutos a 20°C, o sobrenadante, as células mononucleares e a solução de Percoll foram removidos e o precipitado de células vermelhas e granulócitos foi coletado. As hemácias foram lisadas com solução de lise (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃ e 0.1 mM EDTA) por 10 minutos no gelo.

Os eosinófilos foram isolados utilizando o método de seleção negativa (92,93). Inicialmente, após a lise das hemácias, a suspensão contendo os granulócitos foi lavada duas vezes com tampão PBS/BSA 1% e o número de células totais calculado pela contagem em hematocitômetro. Em seguida, a cada 5x10⁷ células foram adicionados 15μL do coquetel de anticorpos (anti-CD2, CD14, CD16, CD19, CD56, CD123 e CD235a) (MACS, Miltenyi Biotec) marcados com biotina e diluído em tampão PBS/BSA/EDTA. A suspensão celular foi mantida em geladeira por 15 minutos, sendo posteriormente incubada com *beads* magnéticas conjugadas à anti-CD16 (MACS, Miltenyi Biotec) (35μL de para cada 5x10⁷ células). Finalmente a suspensão recebeu 30μL de *microbeads* magnéticas conjugadas a um anticorpo monoclonal (IgG1 de camundongo) anti-biotina (MACS, Miltenyi Biotec), para a mesma proporção celular mencionada anteriormente. Nesta etapa, as beads se ligam aos anticorpos biotinilados do coquetel, também diluídos em tampão PBS/BSA/EDTA. Após incubação por 15 minutos na geladeira a reação foi interrompida adicionando-se tampão PBS/BSA/EDTA e as células foram centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em tampão PBS/BSA/EDTA. A coluna magnética

utilizada foi do tipo LS (MACS, Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA), que apresenta uma boa performance, mesmo para volumes maiores de sangue.

A técnica de isolamento dos eosinófilos utilizando 2 tipos de *beads* magnéticas tem o objetivo de eliminar a contaminação com outros tipos celulares, além de neutrófilos.

Após o processo de separação, as células selecionadas foram contadas em hematocitômetro, sendo a viabilidade celular avaliada por meio da coloração com azul de Tripan. As células obtidas foram avaliadas por citometria de fluxo, que mostrou uma pureza acima de 98,9% (figura 32 do apêndice).

5. Dosagem de proteínas específicas de grânulos dos eosinófilos (MBP, ECP, EPO e EDN), RANTES, eotaxina, MIG/CXCL9 e IP-10/CXCL10 no soro de pacientes e controles

A dosagem de RANTES, eotaxina, CXCL9, CXCL10 no soro dos pacientes (antes e durante o tratamento antifúngico) e no grupo controle foi realizada pela técnica de ELISA utilizando kits da marca R&D Systems (Mineapolis, Minnesota, EUA), com limite de detecção de 15,625 pg/mL; 15,625 pg/mL; 62,5 pg/mL; 31,25 pg/mL, respectivamente. Para a dosagem das proteínas específicas de grânulos dos eosinófilos foram utilizados kits de ELISA da marca USCN Life Science Inc (Wuhan, Hubei, China) (MBP, EPO e ECP) e da ALPCO Immunoassays (Salem, New Hampshire, EUA) (EDN), com limite de detecção de 0,47ng/mL; 1,25ng/mL; 0,156ng/mL; 0,25ng/mL, respectivamente.

6. Imuno-histoquímica (IHQ)

Biópsias de linfonodos e fígado dos pacientes incluídos no estudo foram avaliadas por IHQ quanto a expressão de RANTES, eotaxina, MBP, IL-25 e IDO (Tabela V no apêndice).

As biópsias foram fixadas em formol a 4%, incluídas em parafina e cortadas em micrótomo. Cortes seriados de 4 µm foram desparafinizados e hidratados; a recuperação antigênica foi realizada com tampão específico para cada anticorpo (citrato pH 6.0 ou Tris-EDTA pH 8.0) em panela a vapor durante 45 minutos. As etapas seguintes foram realizadas utilizando o kit MACH 4 Biotin-Free Detection (Biocare Medical) de acordo com os procedimentos estipulados pelo fabricante. Primeiramente foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 10 volumes, seguido de incubação com reagente de bloqueio para proteínas, com posterior lavagem e incubação com os anticorpos primários, *overnight*. Posteriormente, os cortes foram incubados com MACH4 Probe e depois com o Polymer Detection. As marcações foram reveladas com a utilização do substrato 3,3'- diaminobenzidina (DAB). Entre todas as etapas, as lâminas foram lavadas com tampão PBS no tempo estipulado pelo fabricante do kit. Após o término da reação, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas com entelan (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, USA). Marcações positivas foram identificadas pela coloração marrom.

7. CONDIÇÕES DA CULTURA

Para avaliar o efeito da exposição a leveduras de *P. brasiliensis*, após a purificação, os eosinófilos foram mantidos somente em meio de cultura MEM (sem estímulo) ou então foram estimulados por 4 horas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (1 levedura para cada 100 eosinófilos) das cepas Pb18 ou Pb265.

7.1. Quimiotaxia

Para avaliar a capacidade quimiotática, eosinófilos isolados de pacientes com a forma juvenil da PCM e voluntários sadios foram ressuspensos em meio MEM (Meio Mínimo essencial de Eagle, Sigma Chemical CO., St Louis, MO, USA) na concentração de 3×10^6 células/mL.

A parte inferior de uma câmara de quimiotaxia de 96 cavidades (Neuroprobe Inc., Cabin John, MD, EUA) foi preenchida com 29 μ L de RANTES ou eotaxina (100ng/mL) ou IL- 5 (100 e 50 ng/mL) ou MEM não suplementado (migração espontânea) e a parte superior foi separada da inferior por uma membrana de polycarbonato de 5 μ m. Posteriormente, sobre a membrana de polycarbonato, foram adicionados 25 μ L da suspensão de eosinófilos *ex-vivo* ou após incubação por 4 horas na presença ou ausência de leveduras de *P. brasiliensis*,

A câmara foi incubada por duas horas em estufa a 5% de CO₂, 37 ° C. Após esse período, as células que não migraram foram removidas com o auxílio de uma gaze e então a placa foi centrifugada a 200g por 5 minutos a 20°C. O filtro foi cuidadosamente removido e o volume dos poços foi reajustado para 29 μ L, transferido para um microtubo e diluído 1:5. Alíquotas de 50 μ L correspondentes a cada condição foram transferidas placas de 96 poços, seguido da adição de 50 μ L do substrato da EPO (1mM H₂O₂, 1mM OPD e 0.1% Triton X-100 em tampão Tris, pH 8). Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 25 μ L de H₂SO₄ 4M/poço. A absorbância foi medida em leitor de microplaca (Bio-rad Laboratories Inc., Philadelphia, PA, USA) a 490 nm. O número de células que migrou para a parte inferior da placa foi determinado através da medida da EPO residual comparada a uma curva padrão de concentrações de EPO obtida a partir da lise de números determinados de eosinófilos (75,94). A porcentagem de migração foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ migração} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células migrantes em resposta ao estímulo}}{\text{N}^\circ \text{ de células que migrantes espontaneamente}} \times 100$$

7.2. Avaliação da capacidade de adesão de eosinófilos a células endoteliais pulmonares humanas (HLEC)

Células endoteliais pulmonares humanas (linhagem HLEC) (95), gentilmente cedidas pelo Prof. Fábio Costa, Instituto de Biologia, UNICAMP, foram expandidas em garrafas de cultura de 75 mm² em meio DMEM/F12 suplementado com 10% de soro bovino fetal (DMEM-SBF), em estufa de CO₂ (5%) a 37°C. Ao atingirem 80-90% de confluência, as células foram coletadas, centrifugadas e contadas. Após a avaliação da viabilidade, as células foram novamente ressuspensas em meio DMEM-SBF, transferidas para placas de cultura de 96 poços (2x10⁴ células/poço) e incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37°C, por 2 dias (tempo necessário para atingir novamente 90% de confluência). Após esse período, foi adicionado meio DMEM-SBF fresco e parte das células foram estimuladas com TNF- α (10ng/mL) por um período de 4h (96). Após esse período o meio foi removido e as HLECs estimuladas ou não com TNF- α foram utilizadas para os testes de adesão.

Para avaliar se a estimulação com RANTES (100ng/mL), eotaxina (100ng/mL) ou IL-5 (100, 10 e 2,5ng/mL) aumentava a capacidade de adesão às HLEC, foram realizados 2 tipos de procedimentos. Primeiramente, os eosinófilos *ex-vivo* foram incubados por 1h com as HLECs na presença dos estímulos descritos. Em outro protocolo os eosinófilos foram previamente incubados por 30 minutos com RANTES (100ng/mL), eotaxina (100ng/mL) ou IL-5 (100, 10 e 2,5ng/mL) e só então adicionados às HLECs. Após uma hora de incubação com as HLEC, os eosinófilos foram retirados e cada poço foi lavado duas vezes com meio MEM-SBF. Ao final das lavagens foi adicionado 50 μ L de meio MEM. A dosagem da EPO residual foi realizada adicionando 50 μ L do substrato da EPO (1mM H₂O₂, 1mM OPD e 0.1% Triton X-100 em tampão Tris, pH 8) a cada poço da placa de adesão e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 25 μ L de H₂SO₄ 4M em cada poço e a absorbância foi medida a 490 nm em leitor de microplaca (Bio-Rad Laboratories Inc., Philadelphia, PA, EUA). O número de células aderidas foi determinado pela dosagem da EPO

residual e o número de células aderidas foi calculado de acordo com a dosagem de EPO de uma curva de células (94).

7.3. Determinação da produção de H_2O_2

Quando ocorre fagocitose, ou após a ação de estímulos como o PMA, as células apresentam consumo aumentado de oxigênio (explosão respiratória), aumento da glicólise, e ativação da enzima NADPH oxidase, que converte o oxigênio molecular em ânion superóxido, instável, e que rapidamente se transforma em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A avaliação da produção de H_2O_2 pode ser feita utilizando-se o substrato fluorogênico dihidrorodamina 123 (DHR123) que, após a ação de radicais livres (metabólitos tóxicos do oxigênio como o ânion superóxido ou o peróxido de hidrogênio) se transforma em um composto fluorescente, a rodamina 123 (R123). Após excitação pelo laser do citômetro de fluxo as células fagocíticas com metabolismo oxidativo ativado emitem fluorescência e são detectadas por citometria de fluxo (97,98) .

Eosinófilos do sangue periférico de doadores saudáveis e dos pacientes com a FJ da PCM foram incubados por 4 horas na ausência e presença da citocina recombinante IL-5 (concentrações de 2,5 e 10ng/mL) e de leveduras de *P. brasiliensis* (cepas Pb18 ou Pb265). Após a incubação os eosinófilos foram coletados, submetidos à lavagem, centrifugados e ressuspensos em PBS estéril (3×10^6 células/mL) e incubados com 4 μ M de DHR-123 (Invitrogen - Molecular Probes) por 30 minutos em estufa (37°C e 5% de CO_2). Após a incubação as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio MEM e incubadas com leveduras de *P. brasiliensis* (razão 100 eosinófilos para cada levedura) por 1 hora a 37°C em estufa de CO_2 (5%). Como controle positivo foram utilizados eosinófilos estimulados com PMA (10ng/mL - 1 hora) (99). Após o período de incubação os eosinófilos foram coletados e a leitura foi realizada em citômetro de fluxo, analisando-se a intensidade média de fluorescência (IMF) de cada condição (análise na figura 34 do apêndice).

7.4. Avaliação da atividade fungicida direta dos eosinófilos sobre as leveduras Pb18 e Pb265 de *P. brasiliensis*

A atividade fungicida direta dos eosinófilos sobre leveduras de *P. brasiliensis* foi avaliada incubando em placas de cultura de 96 cavidades com fundo em U, 2×10^5 eosinófilos/cavidade em meio MEM juntamente com células leveduriformes das cepas Pb18 e Pb265 na proporção de 1 levedura para cada 100 eosinófilos, em alguns experimentos foi utilizado a proporção de 1 levedura para cada 200 eosinófilos (figura 35 do apêndice). Essa cultura permaneceu por 4h em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e, posteriormente foram plaqueadas em meio BHI (suplementado com fator de crescimento obtido de culturas de *P. brasiliensis*, soro normal de cavalo e solução antibiótica penicilina/estreptomicina) e incubadas em estufa a 36°C.

Para a avaliação da ação da IL-5 sobre a atividade citotóxica direta, em paralelo foram feitas culturas nas mesmas condições descritas acima, adicionando-se IL-5 recombinante (Peprotech) em diferentes concentrações. A cultura também permaneceu por 4h em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e após esse período foi plaqueada em meio BHI (suplementado com fator de crescimento obtido de culturas de *P. brasiliensis*, soro normal de cavalo e solução antibiótica penicilina/estreptomicina) e incubadas em estufa a 36°C.

O número de CFUs foi determinado a partir do 5º até o 30º dia de cultura e então corrigido pelo fator de diluição e expresso em número de CFUs/mL.

7.5. Avaliação da expressão de genes associados a atividade de eosinófilos

Extração do RNA

A expressão do RNA mensageiro (RNAm) de diversos genes associados à atividade dos eosinófilos foi avaliada por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR).

A suspensão de eosinófilos na condição *ex-vivo* ou culturas incubadas durante 4 horas com leveduras de *P. brasiliensis* foram centrifugados a 300g por 10 minutos, o sobrenadante descartado, o precipitado de células ressuspenso vagarosamente em 500 µL de Tri-Reagent® solution (Ambion The RNA Company, USA) e armazenado em -80°C, por no máximo 24h.

Para a extração de RNA, foram adicionados 150 µL de clorofórmio à solução obtida anteriormente, seguido de agitação (vortex) por 10 segundos. A solução foi então incubada em gelo por 10 minutos e centrifugada por 15 minutos a 12000g, a 4°C. A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo RNase e DNase free ao qual foi adicionado igual volume de isopropanol (± 250 µL) e 1,2 µL de LPA (poliacrilamida linear – Ambion - 20µg/µL) para atuar como carreador. A solução foi agitada (vortex) por 10 segundos e incubada a -20°C por 45 minutos. Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 12000g a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi removido cuidadosamente sendo adicionados 0,8 mL de etanol a 75% gelado. Os tubos foram centrifugados novamente por 10 minutos a 12000g à temperatura ambiente. O etanol foi removido e o precipitado de RNA foi dissolvido em 35 µL de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). A quantidade de RNA foi estimada por meio da leitura das amostras em espectrofotômetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). A pureza do RNA obtido foi inferida pela razão entre as absorbâncias obtidas a 260 nm e 280 nm, que deve ser próxima a 2.

Síntese de cDNA

Antes da síntese do cDNA, as amostras obtidas foram submetidas ao tratamento com DNase para a remoção de possíveis cadeias de DNA genômico contaminante. Para tanto, 1 µg de RNA total foi diluído em água DEPC em um volume final de 24,7µL e foram acrescentados 5 µL do mix contendo 3µL de tampão 10x concentrado e 2µL de DNase (Ambion The RNA Company, USA). A seguir as amostras foram incubadas a 37°C durante 30 minutos para a remoção do DNA. Após a incubação foram adicionados 0,3 µL de EDTA (0,5M pH8) a cada tubo, seguido de incubação a 75°C por 10 minutos para interrupção da atividade enzimática da DNase.

Para a síntese do cDNA, ao RNA tratado foi adicionado 0,5µL de oligo dT₁₆ e 0,5µL de *primers* randômicos (Applied Biosystems, California, USA). A mistura foi aquecida a 70°C por 10 minutos e resfriada rapidamente em gelo. A seguir foram adicionados 18µL de um *mix* composto por: 10µL de tampão de síntese; 2,5µL de dNTP (10mM); 5µL de DTT (0,1M); 0,25µL de superscript R/T III (200U/µL-(Invitrogen)) e 0,25µL de água tratada com DEPC. A mistura foi então incubada à temperatura ambiente por 10 minutos, e a seguir a 40°C por 50 minutos. A atividade enzimática foi interrompida pela incubação a 90°C por 5 minutos, seguida por incubação a 4°C por 5 minutos. A mistura foi centrifugada rapidamente, adicionando-se 1µL de RNase humana, incubando-se a 37°C por 20 minutos, para a remoção das moléculas restantes de RNA. A quantidade de cDNA foi estimada por meio da leitura das amostras em espectrofotômetro a 260/280 nm (Nanodrop 1000, Thermo Scientific, USA). Após a quantificação as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

qRT-PCR

O qRT-PCR foi realizado em equipamento de análise em tempo real StepOne (Applied Biosystems, California, USA) utilizando o método do corante intercalante SybrGreen (100). Em cavidades de placas de 100 µL foram

adicionados 3µL de cDNA (contendo 300 ng de cDNA) (ou de água tratada com DEPC no caso do controle negativo), 1µL do primer sense e 1µL do primer anti-sense previamente diluídos na concentração de 60-80 pM/reação (tabela VI e figura 36 no apêndice) e 5µL do SYBR®Green PCR Master mix (Applied Biosystems, Warrington, UK). As amostras foram colocadas no aparelho de PCR em tempo real e submetidas a 40 ciclos de amplificação: 95°C por 15 segundos, seguido de um período de anelamento/ extensão a 60°C por 1 minuto. Para avaliar a especificidade dos primers utilizados, em cada reação foi elaborada uma curva de *melting* (aquecimento gradual da amostra amplificada de 60°C a 95°C, com incremento de 0,3°C) na qual é possível observar a dissociação dos produtos de amplificação. Os resultados foram analisados quanto à expressão do gene de interesse de cada amostra, utilizando como gene normalizador o GAPDH e como amostra de referência o cDNA obtido a partir do pool das amostras de cDNA dos controles e dos pacientes. Os resultados foram expressos como concentração relativa calculada conforme descrito por Pfaffl (2001) (101) utilizando as eficiências de amplificação de cada *primer*, conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Expressão relativa} = \frac{(E_{\text{gene alvo}})^{\Delta\text{Ct gene alvo}}}{(E_{\text{gene referência}})^{\Delta\text{Ct gene referência}}}$$

Onde $E_{\text{gene alvo}}$ é a eficiência de amplificação da reação com o *primer* de interesse (p.e. eficiência do primer para MBP = 99,161); $E_{\text{gene referência}}$ é a eficiência de amplificação da reação com o primer do gene normalizador (GAPDH= 102,739); $\Delta\text{Ct gene alvo}$ é igual ao valor de Ct de uma amostra controle amplificada com o primer do gene de interesse (*pool* de eosinófilos *ex vivo* para o primer avaliado) menos o Ct de amostra para o mesmo gene (p.e. eosinófilos do paciente LDS nas condições *ex-vivo*, incubados 4h sem estímulo ou após estimulação com leveduras Pb18 e Pb265); $\Delta\text{Ct gene referência}$ é igual ao valor de Ct de uma amostra controle amplificada com o *primer* do gene normalizador (*pool* de

eosinófilos *ex vivo* para o *primer* GAPDH) menos o Ct de amostra para o mesmo gene (p.e. eosinófilos do paciente LDS nas condições *ex-vivo*, incubados 4h sem estímulo ou após estimulação com leveduras Pb18 e Pb265).

7.6. Caracterização dos marcadores de superfície de eosinófilos por citometria de fluxo

A caracterização dos marcadores de superfície dos eosinófilos isolados do sangue periférico dos pacientes com a forma juvenil da PCM e do grupo controle foi realizada por citometria de fluxo. Eosinófilos *ex-vivo* ou após incubação por 4 horas na presença ou ausência do fungo *P. brasiliensis* foram incubados com 200µL de soro AB humano durante 10 minutos a 4°C. Em seguida foi adicionado 1 mL de tampão de diluição [PBS-BSA (0,1%), NaN₃ (0,2mM)] e o tubo foi centrifugado (300g por 10 minutos a 4°C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em tampão de diluição. Após esse procedimento, 20µL da suspensão de células foram distribuídos em placas de 96 cavidades com fundo em U, contendo os seguintes anticorpos: anti-CD16 (FITC), anti-CD11a (FITC), anti-CD54 (FITC), anti-FcεR1α (FITC), anti-TLR2 (FITC), anti-CD86 (FITC), anti-TLR4 (PE), anti-HLA-DR (PE), anti-CD23 (PE), anti-CD11b (PE), anti-CD80 (PE), anti-CCR3 (PE), anti-CD69 (PE-CY5), anti-CD49d (CYCH), assim como os anticorpos utilizados como controle de isotipo, diluídos no tampão de diluição. Após 20 minutos de incubação a 4°C no escuro, foram adicionados 120 µL de tampão de diluição, centrifugando-se por 10 minutos a 300g, a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspendidas em 200 µL de formaldeído 2%. Após a transferência para tubos apropriados, a leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACScalibur/Becton & Dickson, EUA). Para cada amostra um mínimo de 25.000 eventos foram adquiridos. Para a análise dos resultados foi utilizado o programa FSC Express v.3.00.0320 (De Novo Software, EUA), sendo considerada a porcentagem de células positivas para cada parâmetro na população isolada de eosinófilos.

8. Análise Estatística

A comparação das variáveis entre pacientes e controles foi feita utilizando-se o método não paramétrico de Mann Whitney e teste t não pareado. Para a comparação antes e após tratamento foi utilizado teste t pareado. Foram considerados significantes valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

1. Descrição dos pacientes incluídos no estudo

Foram incluídos no estudo 14 pacientes atendidos no Ambulatório e Enfermaria de Pediatria e uma paciente do ambulatório de Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas da UNICAMP, sendo que desse total, 13 foram seguidos durante o tratamento antifúngico.

A tabela I mostra que a idade dos pacientes variou de 5 a 14 anos (média: 9,57 anos) e a proporção do sexo masculino e feminino foi de 1:1. Também foi incluída no estudo uma paciente (LCO) com 32 anos de idade, que apresentava a forma juvenil da PCM e eosinofilia no sangue periférico.

Os órgãos mais acometidos foram linfonodos (100%), fígado (33,3%), ossos (13,3%) e pele (4%).

O tratamento mais utilizado foi Sulfametoxazol + Trimetoprima (Bactrin®) (SMZ + TMP) na concentração de 8mg/kg/dia. Alguns pacientes receberam itraconazol (5-10 mg/kg/dia).

A paciente MGO foi tratada com prednisona (1mg/kg/dia) por 15 dias, seguido de SMT/TMP pelo período de um ano.

Tabela I: Dados dos pacientes incluídos no estudo

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Órgãos acometidos	Tratamento
TCSJ	9	M	Linfonodos, pele e fígado	Itraconazol
ECD	14	F	Linfonodos, ossos	SMT+TMP
MGO	12	M	Linfonodos, pele e fígado	Corticóide SMT+TMP
CSS	7	F	Linfonodos e ossos	SMT+TMP e Itraconazol
WCPS	13	M	Linfonodos, pele e fígado	Itraconazol
LDS	5	M	Linfonodos e fígado	SMT+TMP
FCDS	8	F	Linfonodos, pele e fígado	SMT+TMP
MIO	7	M	Linfonodos	SMT+TMP
AMRM	8	M	Linfonodos	SMT+TMP
AFM	11	M	Linfonodos	SMT+TMP
GS	10	F	Linfonodos e pele	SMT+TMP
SCR	11	F	Linfonodos	SMT+TMP
PRPS	9	F	Linfonodos e pele	SMT+TMP
GCC	10	F	Linfonodos	SMT+TMP
LCO	32	F	Linfonodos	SMT+TMP

2. Variação do número de eosinófilos, concentração de Proteína C reativa e título de anticorpos em pacientes com a forma juvenil da PCM ao longo do tratamento antifúngico

O número absoluto de eosinófilos no sangue periférico, avaliado antes do tratamento antifúngico (T0), encontrava-se aumentado para a maioria dos pacientes (84,6%), variando de 0,65 a $12,93 \times 10^3/\text{mm}^3$. Dois pacientes, MIO e GS, apresentaram número de eosinófilos dentro dos valores de referência durante todo o período de tratamento antifúngico (Tabela II). No grupo controle o número de eosinófilos variou de 0,06 a $0,33 \times 10^3/\text{mm}^3$.

O título inicial de anticorpos anti-*P. brasiliensis* no soro, avaliado pela reação de imunodifusão, variou de 1/2 a 1/64 (Tabela II). Em dois pacientes a pesquisa de anticorpos pela técnica de imunodifusão foi negativa, apesar do achado do fungo em biópsia de linfonodos. Foi então realizada a técnica de ELISA com a gp43 de *P. brasiliensis* como antígeno, que evidenciou anticorpos em títulos elevados em ambos (AFM, título 1/51.200; SCR, título 1/12.800). Todos os indivíduos participantes do grupo controle apresentaram pesquisa negativa de anticorpos anti-*P. brasiliensis*.

A dosagem da proteína C reativa, marcador inflamatório sistêmico, mostrou concentrações elevadas em todos os pacientes antes do tratamento antifúngico, com valores que variaram de 1,55 a 17,5 mg/dL. (Tabela II). Por outro lado, indivíduos do grupo controle apresentaram apenas concentrações basais deste marcador, que variaram de 0,06 a 0,45 mg/dL.

O número absoluto de eosinófilos, o título de anticorpos anti-*P. brasiliensis* e a concentração de PCR diminuíram durante o tratamento (Tabela II), com exceção do paciente LDS que manteve o título de anticorpos 1/16 mesmo 1 ano após a terapia antifúngica. Entre o 3º e 6º mês de tratamento do paciente AMRM observamos um pequeno aumento do número de eosinófilos concomitante com um aumento na proteína C reativa (PCR).

A paciente ECD estava residindo no exterior quando a doença foi diagnosticada. De volta ao Brasil, foi atendida no Hospital das Clínicas da

UNICAMP, onde iniciou tratamento e permaneceu apenas 3 semanas. Foram coletadas 2 amostras de sangue com intervalo de 2 semanas, cuja análise mostrou redução da PCR, enquanto o título de anticorpos não se alterou.

A paciente CSS teve fratura óssea secundária à infecção pelo *P. brasiliensis*, sendo submetida a várias cirurgias durante o período de tratamento, que se iniciou com SMT/TMP por 28 dias, seguido de Itraconazol por 14 dias e novamente SMT/TMP até 12 meses de acompanhamento.

Tabela II: Número de eosinófilos, concentração sérica de proteína C reativa (PCR) e de anticorpos anti-*P. brasiliensis* em pacientes com PCM antes (T0) e após diferentes tempos (T1m – T14m) de tratamento antifúngico

Paciente	Tempo de tratamento	Eosinófilos Nº absoluto x 10 ³ /mm ³ (%) *	PCR (mg/dL) #	Anticorpos anti- <i>P. brasiliensis</i> (título)
TCSJ	T 0	2,4 (5)	13,10	1/64
	T 2m	1,42 (12,2)	8,23	1/8
	T 4m	0,46 (3,6)	0,58	1/8
	T 14m	0,5 (6)	0,07	1/1
MGO	T 0	5 (35,4)	9,09	1/32
	T 1m	2,6 (21)	4,59	1/8
	T 3m	0,94 (12,1)	0,881	1/8
	T 12m	0,21 (3,4)	< 0,02	negativo
ECD	T 0	1,4 (19,5)	2,94	1/32
	T 9d	-	1,29	1/32
WCPS	T 0	9,68 (34,8)	15,5	1/32
	T 3m	0,5 (6)	0,05	1/8
	T 12m	0,37 (6,6)	< 0,02	negativo
FCDS	T 0	2,36 (18,2)	12,6	1/8
	T 1m	0,42 (6,2)	4,4	1/8
	T 3m	0,47 (11,2)	0,11	1/8
	T 12m	0,41 (8,1)	0,04	negativo
MIO	T 0	0,29 (3,3)	8,99	1/32
	T 1m	0,1 (2)	0,83	1/16
	T 6m	0,16 (2,4)	0,3	1/8

Continuação da tabela II

Paciente	Tempo de tratamento	Eosinófilos Nº absoluto x 10 ³ /mm ³ (%)*	PCR (mg/dL) #	Anticorpos anti- <i>P. brasiliensis</i> (título)
LDS	T 0	1,88 (8)	9,32	1/16
	T 5m	-	0,18	1/16
	T 12m	0,45 (5,6)	0,08	1/16
CSS	T 0	1,5 (8)	14,6	1/32
	T 1m	1,08 (9,9)	1,99	1/16
	T 5m	0,65 (6,2)	0,29	1/2
	T 14m	1,31 (10)	0,11	1/1
AMRM	T 0	2,54 (17)	15,4	1/32
	T 3m	0,51 (9,1)	0,074	1/16
	T 6m	0,62 (9,5)	0,38	1/8
AFM	T 0	2,32 (16)	6,24	1/51.200 §
	T 3m	0,53 (6,8)	0,34	NR
GS	T 0	0,35 (4,7)	13,9	1/16
	T 3m	0,55 (7,8)	2,38	1/8
SCR	T 0	0,65 (7)	17,5	1/12.800 §
	T 3m	2,94 (29,8)	1,57	NR
PRS	T 0	12,93 (61)	1,55	1/2
	T 3m	0,95 (9,6)	0,023	Negativo

* Valores de referência - N^o eosinófilos: 0,04 - 0,5 x 10³; PCR: <0,5 mg/dL; § ELISA anti-gp43 de *P. brasiliensis*. NR: não realizado

3. Concentrações séricas de proteínas de grânulos de eosinófilos (MBP, ECP, EPO e EDN) e quimiocinas (CCL5, CCL11, CXCL9, CXCL10) nos pacientes com a forma juvenil da PCM (antes e após tratamento antifúngico) e doadores sadios (controles)

Eosinófilos ativados liberam proteínas dos grânulos citotóxicos como a MBP, ECP e EPO, que podem causar dano e disfunção tecidual, além da EDN capaz de ativar células dendríticas promovendo o aprimoramento da resposta Th2 (43,85). Níveis séricos elevados de MBP, EPO, ECP e EDN foram detectados no soro de pacientes com PCM comparados aos controles (figura 1).

Dentre os mediadores produzidos após estímulo inflamatório/infeccioso, as quimiocinas CCL5 (RANTES) e CCL11 (eotaxina) parecem ter ação seletiva na atração de eosinófilos. Além disso, outras quimiocinas como CXCL9 (Mig) e CXCL10 (IP-10) parecem participar da resposta inflamatória em pacientes com PCM (15,54)

Em nosso estudo verificamos que os pacientes com PCM apresentam concentrações séricas significativamente mais elevadas das proteínas de grânulos de eosinófilos, além das quimiocinas RANTES e CXCL9 comparado a controles (figura 1).

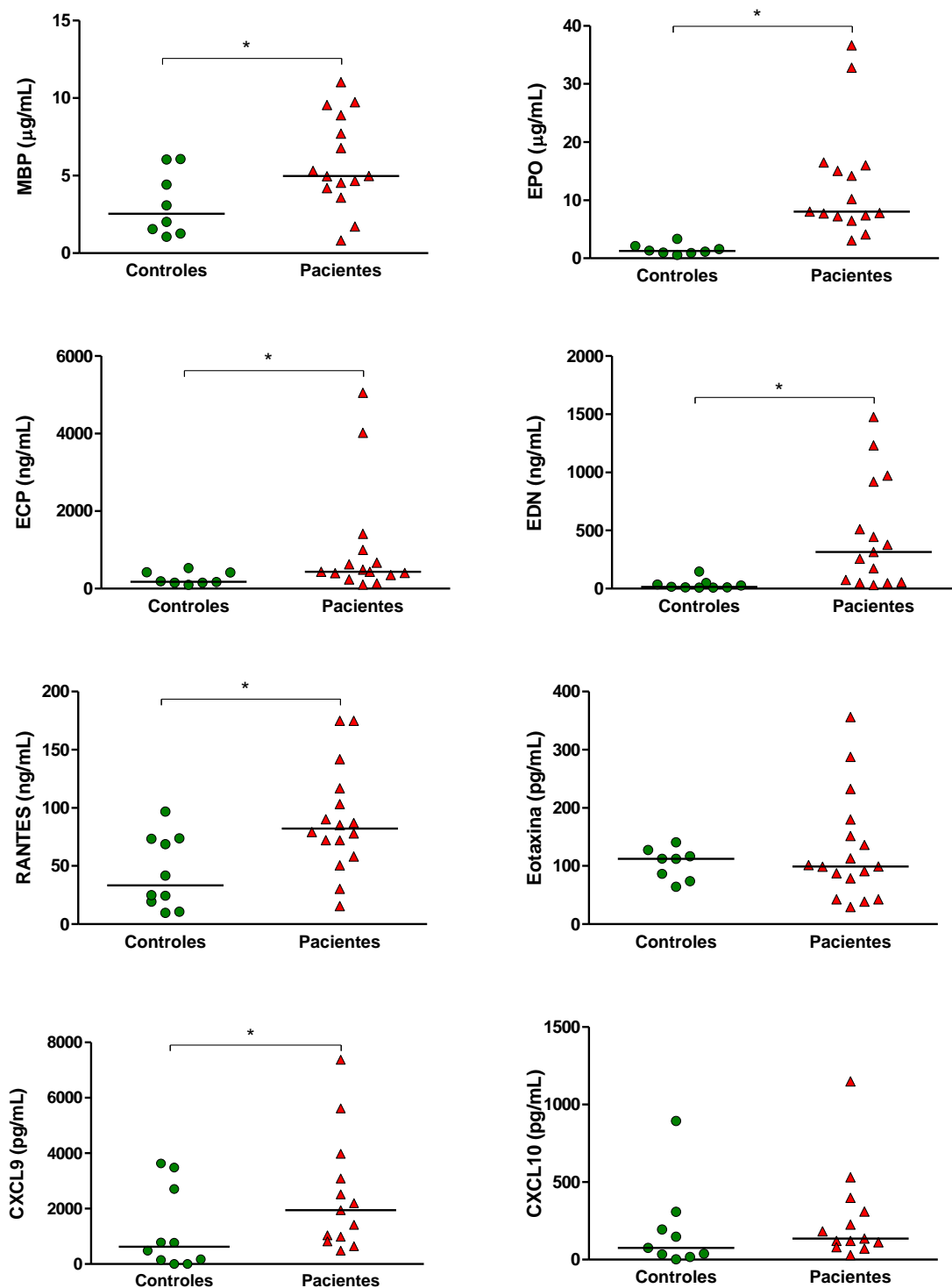


Figura 1: Concentração sérica de proteínas dos grânulos de eosinófilos (MBP, EPO, ECP, EDN) e quimiocinas (RANTES, eotaxina, CXCL9 e CXCL10) em pacientes com a forma juvenil da PCM (n=15) antes do tratamento antifúngico e indivíduos saudáveis (controles, n=10). As barras horizontais representam a mediana. Teste estatístico: Mann Whitney. * $p \leq 0,05$.

A concentração sérica das proteínas dos grânulos eosinófilos (Tabela III) e das quimiocinas CCL5, CCL11, CXCL9 e CXCL10 (Tabela IV) diminui, de maneira geral, ao longo do tratamento antifúngico, em concordância com a diminuição do número de eosinófilos, da resposta inflamatória medida pelo PCR e do título de anticorpos anti-*P. brasiliensis* (tabela II).

O paciente MIO apresentou aumento na concentração de eotaxina, CXCL9 e CXCL10 após 6 meses de seguimento, provavelmente devido a interrupção no tratamento antifúngico, com consequente reagudização do quadro clínico. Nesta paciente foi observado aumento do número e tamanho dos linfonodos e do número de eosinófilos no sangue periférico. Por outro lado, a paciente SCR apresentava um quadro clínico grave de desnutrição, sendo que um aumento nos níveis séricos quimiocinas e do número de eosinófilos no sangue periférico foi observado somente após os primeiros meses de tratamento (tabela III).

Os pacientes TCSJ e CSS apresentaram um aumento no número de eosinófilos no 14º mês de tratamento que foi acompanhado pelo aumento dos níveis séricos das proteínas dos grânulos dos eosinófilos.

Tabela III – Concentrações séricas das proteínas de grânulos de eosinófilos em pacientes com a FJ da PCM antes e durante o tratamento antifúngico

Pacientes	Tempo Tratamento	Nº de eosinófilos/mm ³ (x10 ³)	MBP (µg/mL)	ECP (ng/mL)	EPO (µg/mL)	EDN (ng/mL)
FCDS	T 0	2,36	4,54	104,9	16,01	174,6
	T 3m	0,47	3,13	65,9	1,59	50,3
	T 12m	0,41	1,51	78,3	0,95	51,2
LDS	T 0	1,88	4,67	1411,40	7,73	510,3
	T 5m	-	1,58	155,40	1,87	22,4
	T 12m	0,45	4,17	489,30	2,7	47,2
WCPS	T 0	9,68	11,03	1001,50	7,24	257,9
	T 3m	0,5	11,03	325,40	4,45	135,9
	T 14m	0,37	1,79	179,60	1,92	45,6
TCSJ	T 0	2,4	0,82	4021,00	32,79	919,3
	T 2m	1,42	14,32	258,80	13,68	127
	T 3m	0,46	2,08	84,30	11,01	14,9
	T 14m	0,5	6,86	133,60	11,65	46,3
MGO	T 0	5	4,96	629,80	36,65	973,3
	T 1m	2,6	2,89	297,90	25,01	211
	T 3m	0,94	0,5	49,30	4,45	18,4
	T 12m	0,21	8,29	549,90	2,34	48,3
ECD	T 0	1,40	4,2	237,10	10,18	74,3
	T 9d	-	6,1	140,70	6,96	50,8
MIO	T 0	0,29	9,74	395,20	4,13	31,6
	T 1m	0,1	8,75	241,20	5,21	17,8
	T 6m	0,16	5,11	289,60	1,68	12,7
CSS	T 0	1,50	8,9	665,40	16,47	378,1
	T 1m	1,08	7,24	1356,50	13,88	618,1
	T 5m	0,65	6,7	1280,10	2,8	160,8
	T 14m	1,31	9,6	609,40	4,81	252,7
AMRM	T 0	2,54	9,56	350,40	8	55,6
	T 3m	0,51	5,47	296,50	3,51	101,7
	T 6m	0,62	3,72	189,50	4,82	47,2

Continuação da tabela III

Pacientes	Tempo Tratamento	Nº de eosinófilos/ mm3 ($\times 10^3$)	MBP ($\mu\text{g/mL}$)	ECP (ng/mL)	EPO ($\mu\text{g/mL}$)	EDN (ng/mL)
AFM	T 0	2,32	4,98	487,1	14,19	1232
	T 3m	0,53	3,34	65,5	2,95	74
GS	T 0	0,35	6,78	431,60	7,39	49,8
	T 3m	0,55	4,34	282,60	3,18	60,2
SCR	T 0	0,65	1,72	5053,20	7,79	445,5
	T 3m	2,94	3,55	325,10	7,13	172
PRS	T 0	12,93	5,3	136,4	6,48	1476,8
	T 3m	0,95	4,7	119,1	1,75	152,6

Tabela IV – Concentrações de RANTES, eotaxina, CXCL9 e CXCL10 no soro de pacientes com PCM antes e durante o tratamento antifúngico

Pacientes	Tempo Tratamento	Nº de eosinófilos/mm ³ (x10 ³)	RANTES (ng/mL)	Eotaxina (pg/mL)	CXCL9 (pg/mL)	CXCL10 (pg/mL)
FCDS	T 0	2,36	72	98,71	806,7	111,61
	T 3m	0,47	73,7	63,71	1075,3	193,06
	T 12m	0,41	13,2	59,44	352,1	96,88
LDS	T0	1,88	78	101,60	1064,9	136,4
	T 5m	-	23,76	107,51	760,2	127,0
	T 12m	0,45	63,55	88,79	817	61,8
WCPS	T0	9,68	174,86	356,20	3978,1	225,2
	T 3m	0,5	145,53	161,80	1591,8	110,4
	T 14m	0,37	20,72	51,60	248,8	36,2
TCSJ	T 0	2,4	15,51	179,77	5615,5	530,5
	T 2m	1,42	147,6	171,28	780,8	132,6
	T 3m	0,46	23,26	166,18	161	52,8
	T 14m	0,5	89,96	111,78	1085,6	147
MGO	T 0	5	79,3	287,83	1953,3	183
	T 1m	2,6	33,6	77,33	3430,6	444,4
	T 3m	0,94	10,1	77,33	2552,5	266,5
	T 12m	0,21	66,8	56,56	367,6	111,3
ECD	T 0	1,4	58	42,48	93,9	48,0
	T 9d		63,8	39,25	88,7	48,8
MIO	T 0	0,29	116,7	613,48	2335,6	1257,2
	T 1m	0,1	90,7	751,76	2542,2	1265,5
	T 6m	0,16	57,5	1338,70	3218,8	1307,7
CSS	T 0	1,5	141,86	78,76	1038,38	82,9
	T 1m	1,08	123,94	84,04	1381,38	191,2
	T 5m	0,65	102,96	55,84	1034,61	71,8
	T 14m	1,31	132,07	75,34	655,96	48,8
AMRM	T 0	2,54	174,86	113,28	2515,08	121,16
	T 3m	0,51	94,97	92,48	2081,09	35,55
	T 6m	0,62	64,1	105,56	300,12	12,22

Continuação da Tabela IV

Pacientes	Tempo Tratamento	Nº de eosinófilos/ mm ³ (x10 ³)	RANTES (ng/mL)	Eotaxina (pg/mL)	CXCL9 (pg/mL)	CXCL10 (pg/mL)
AFM	T 0	2,32	90,3	136,12	-	-
	T 3m	0,53	44,7	101,31	-	-
GS	T 0	0,35	86,9	29,35	3092,65	399,27
	T 3m	0,55	68,5	39,84	276,40	86,78
SCR	T 0	0,65	30,3	99,00	7366,89	1149,74
	T 3m	2,94	79,6	109,45	1012,02	292,28
PRS	T 0	12,93	85,2	38,46	645,22	71,21
	T 3m	0,95	57,5	52,54	496,62	99,37

4. Expressão de MBP, RANTES e eotaxina em linfonodos e fígado de pacientes com a forma juvenil da PCM

Biópsias de fígado e linfonodos de pacientes com a forma juvenil da PCM foram avaliadas por IHQ para detecção de MBP, RANTES e eotaxina.

Em ambos os tecidos foi possível visualizar células com morfologia de eosinófilos positivas para MBP no infiltrado inflamatório ao redor de células fúngicas (Figura 2 A e B).

A coloração para RANTES marcou áreas do parênquima hepático, bem como nos hepatócitos, células de Kupfer, gigantócito e células do estroma e endotélio portal (Figura 3A). Já nos linfonodos a reação pode ser visualizada em várias células inflamatórias, estromatosas, endoteliais, e em torno das leveduras (Figura 3B).

A distribuição da eotaxina nos tecidos examinados apresentou-se difusa no citoplasma de hepatócitos, células epiteliais de ductos biliares, células estromatosas e endoteliais e, fortemente, em torno das leveduras (Figura 4A). No linfonodo a marcação foi menos intensa do que a observada no fígado, com algumas células inflamatórias apresentando expressão citoplasmática da eotaxina (Figura 4B).

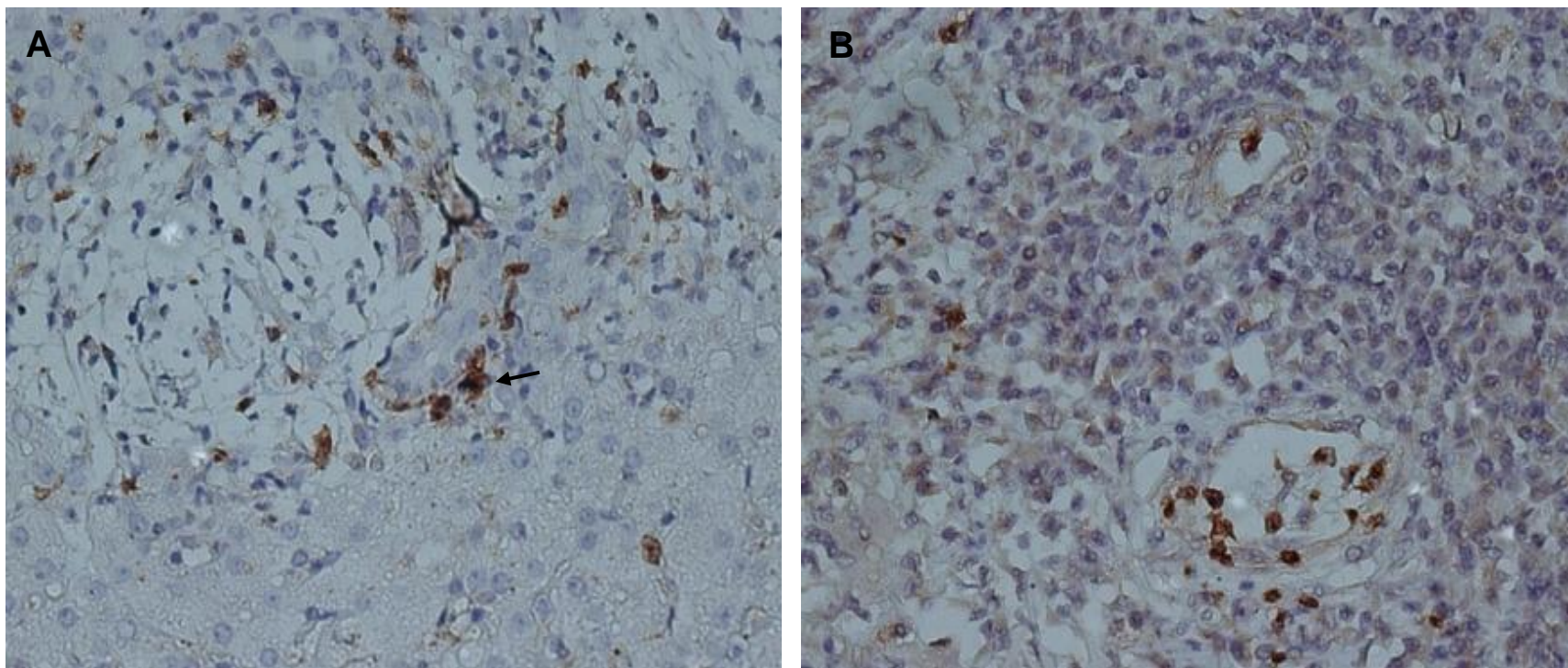


Figura 2. Detecção de MBP no fígado (A) e linfonodo (B) de pacientes com a forma juvenil da PCM. Observa-se marcação da MBP no citoplasma de eosinófilos (seta), no espaço porta, presentes, em maior número, em torno de ductos biliares e em grânulos, nos sinusóides do lóbulo (A); no linfonodo há imuno-expressão apenas no citoplasma dos eosinófilos (B). (400X)

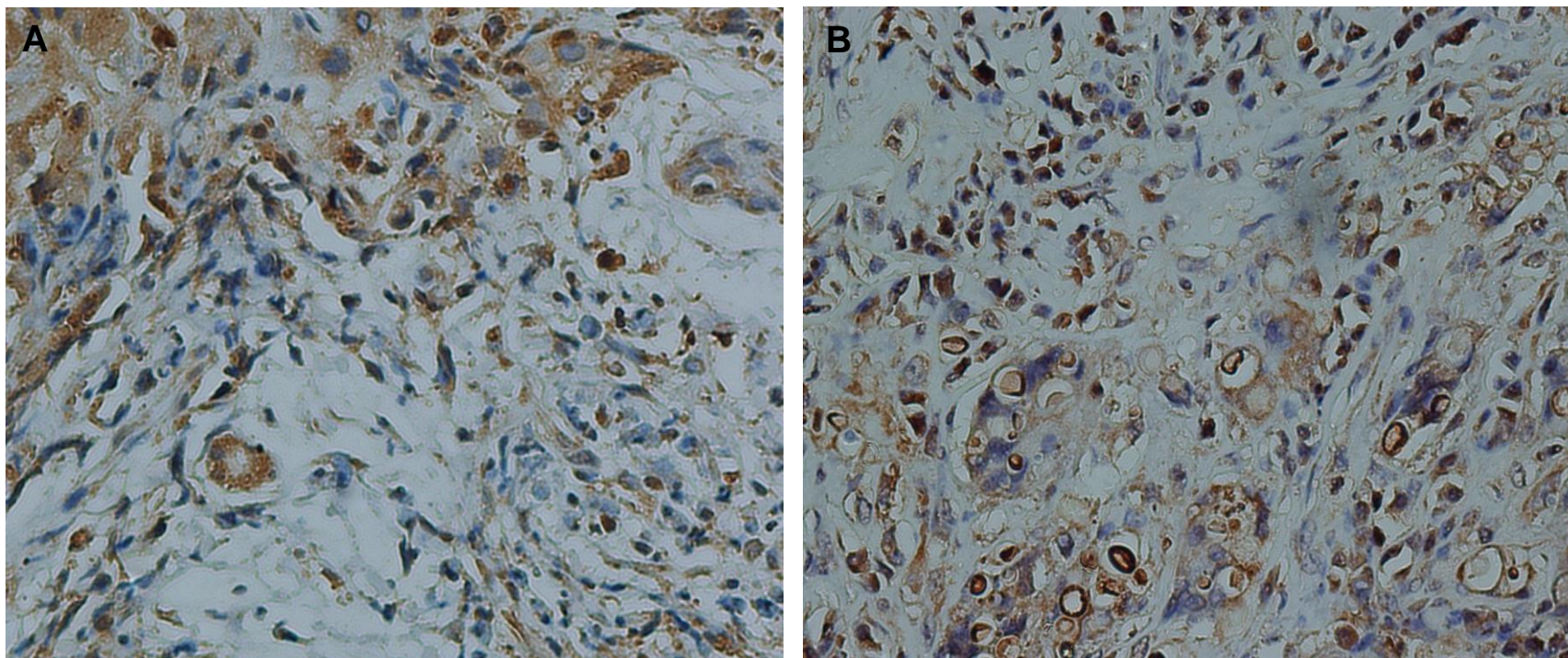


Figura 3. Detecção de RANTES no fígado (A) e linfonodo (B) de pacientes com a forma juvenil da PCM. Marcação foi bem intensa nos hepatócitos, células de Kupfer, gigantócito e células do estroma e do endotélio portal (A) e, no linfonodo, em várias células inflamatórias, estromatosas, endoteliais, e em torno das leveduras(B). (400X)

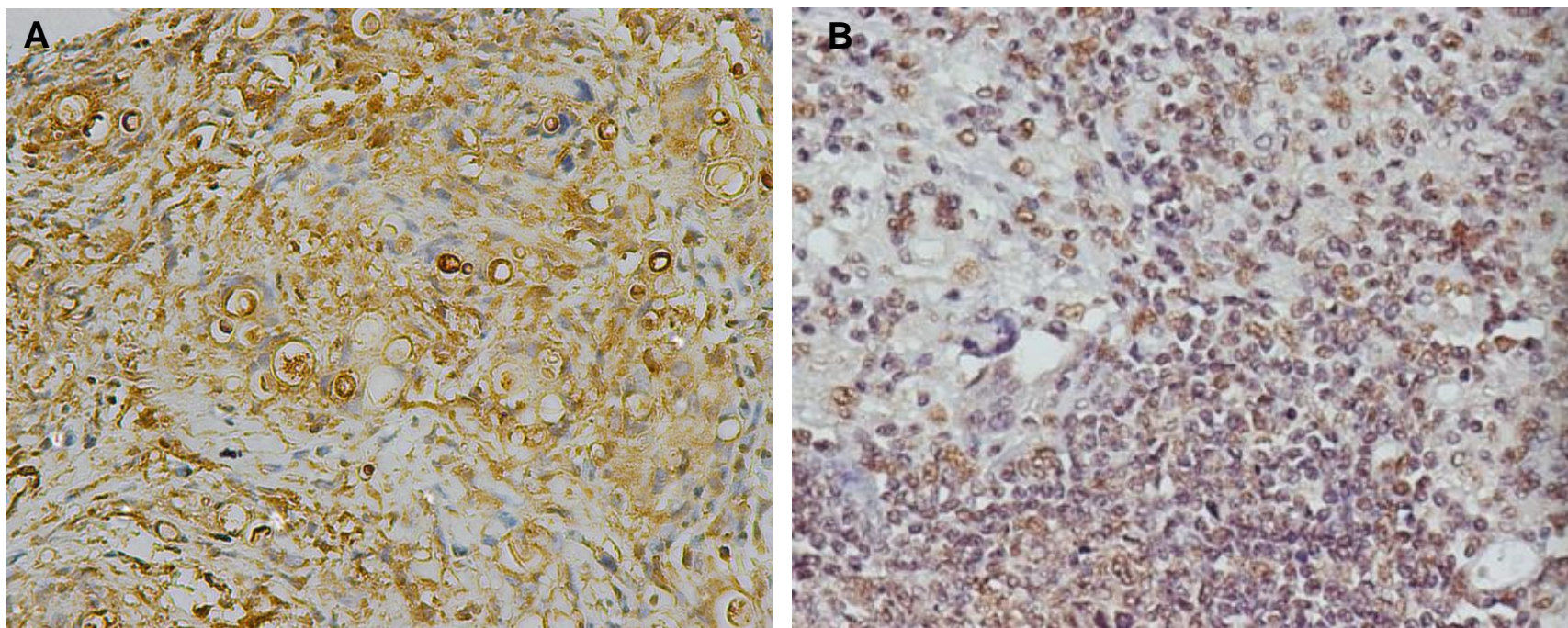


Figura 4. Detecção de eotaxina no fígado (A) e linfonodo (B) de pacientes com a forma juvenil da PCM. Marcação difusa no citoplasma de hepatócitos, células epiteliais de ductos biliares, células estromatosas e endoteliais e, fortemente, em torno das leveduras (A). Parte das células inflamatórias, no linfonodo, apresenta expressão citoplasmática da eotaxina (B). (400X)

5. Resposta quimiotática dos eosinófilos do sangue periférico dos pacientes com a FJ da PCM (antes e durante tratamento antifúngico) e doadores sadios (controles)

O tráfego dos eosinófilos para os sítios inflamatórios envolve uma série de citocinas, moléculas de adesão e quimiocinas como RANTES e eotaxina (25,56).

Avaliamos a capacidade migratória dos eosinófilos de pacientes e controles em resposta a estimulação com RANTES (100ng/mL), eotaxina (100ng/mL) e IL-5 (100 e 50ng/mL) (Figura 5).

Diferenças significativas foram observadas somente em relação à eotaxina. A porcentagem de migração dos eosinófilos dos pacientes com PCM em relação ao grupo controle foi maior após cultura de 4 horas com e sem leveduras de *P. brasiliensis*, Pb18 e Pb265 (Figura 5).

Para os demais estímulos (RANTES e IL-5) eosinófilos de pacientes e controles se comportaram de maneira similar.

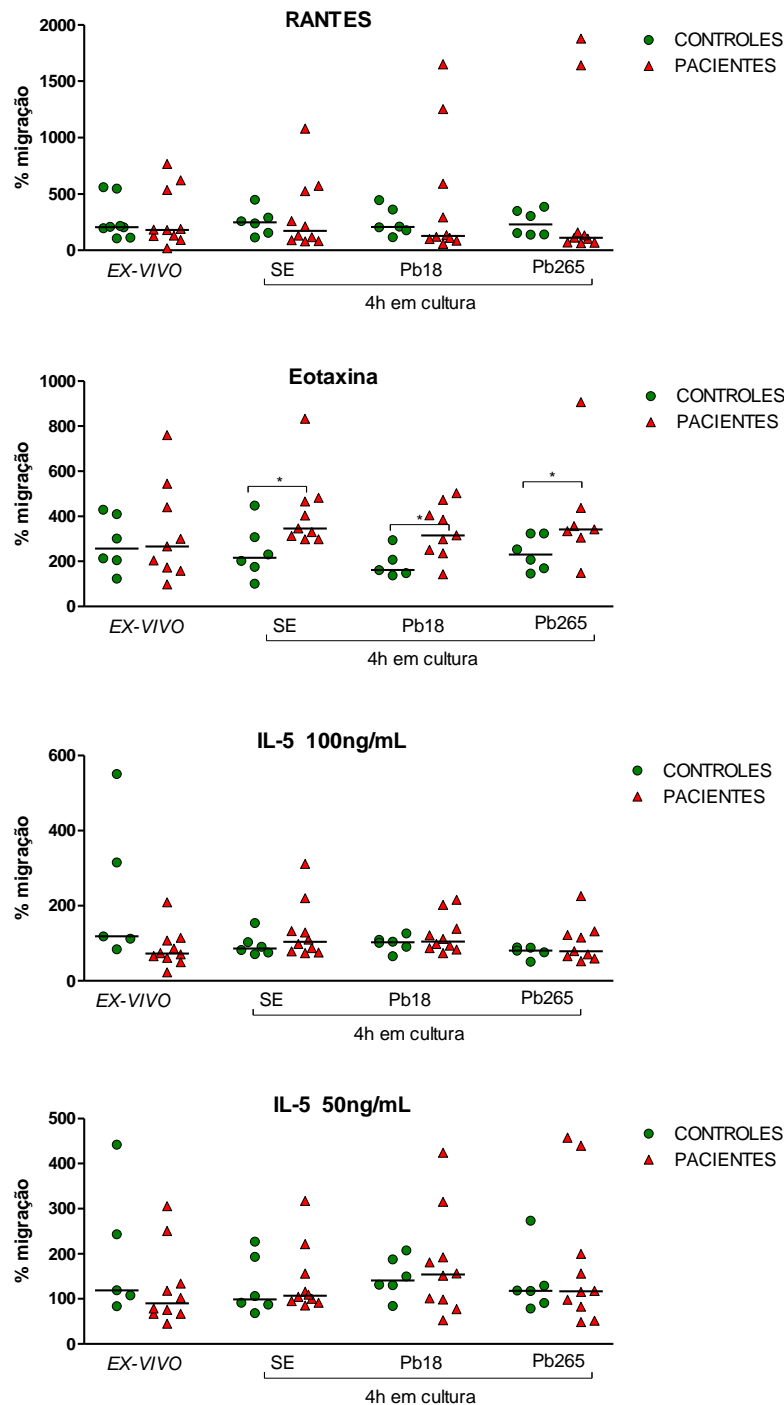


Figura 5: Porcentagem de migração dos eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM (n=9) antes do tratamento antifúngico e de indivíduos saudáveis (controles, n=5) ex-vivo e após incubação por 4h na ausência (SE) ou presença de leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 ou Pb265), em resposta à estimulação com RANTES (100ng/mL), eotaxina (100ng/mL) e IL-5 (100 e 50ng/mL). As barras horizontais representam a mediana. Teste estatístico: Mann Whitney. * $p \leq 0,05$.

Como mostrado anteriormente, durante o tratamento antifúngico há redução do título de anticorpos anti-*P. brasiliensis*, que reflete a diminuição do número de fungos, dos níveis séricos PCR e quimiocinas para a maioria dos pacientes acompanhados no estudo.

De maneira geral a capacidade migratória dos eosinófilos aumenta com o tratamento, especialmente em resposta ao RANTES e à eotaxina. As figuras 6-8 representam a capacidade quimiotática de 3 pacientes durante o tratamento antifúngico. As respostas são variáveis, mas mantêm um padrão de aumento ao final do tratamento.

A capacidade de migração dos eosinófilos do paciente **AMRM** durante o período de 3 meses de tratamento antifúngico foi maior diante dos estímulos RANTES e eotaxina. O número de células que migram diante desses estímulos foi maior nas culturas incubadas por 4h, principalmente quando os eosinófilos foram colocados em contato com leveduras Pb18 (Figura 6). Resultado semelhante também foi observado para a paciente **LDS**, que apresentou aumento significativo da resposta quimiotática após 12 meses de tratamento, também mais evidente aos estímulos RANTES e eotaxina (Figura 7).

Para o paciente **WCPS** as avaliações realizadas após 1, 3 e 14 meses de tratamento mostraram um aumento da atividade quimiotática para RANTES e eotaxina, principalmente nas condições em que os eosinófilos ficaram incubados por 4h na ausência ou presença de leveduras do *P. brasiliensis*. (Figura 8).

Nos 3 casos o aumento da atividade quimiotática correlacionou-se à diminuição do número de eosinófilos na circulação (ver inserto nas figuras 6 - 8).

Diferentemente, os eosinófilos da paciente CSS, que ainda se encontra em acompanhamento ortopédico devido a deformações ósseas promovidas pela infecção fúngica, apresentaram um padrão de aumento da capacidade quimiotática até o 5º mês de tratamento antifúngico, seguido de diminuição dessa quimiotaxia ao final de 14 meses. Neste caso embora o número de eosinófilos no sangue periférico tenha caído em 5 meses (de 1,5 para $0,65 \times 10^3/\text{mm}^3$), aos 14

meses de tratamento houve uma elevação (de 0,65 para $1,31 \times 10^3/\text{mm}^3$), acompanhada da redução da atividade quimiotática (Figura 9).

De maneira geral a IL-5 (100 e 50 ng/mL) promoveu níveis basais de quimiotaxia, com resposta semelhante à condição sem estímulo (Figuras 6 - 9). A estimulação com as leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265) não resultou em aumento na resposta quimiotática, comparado à condição sem estímulo (SE).

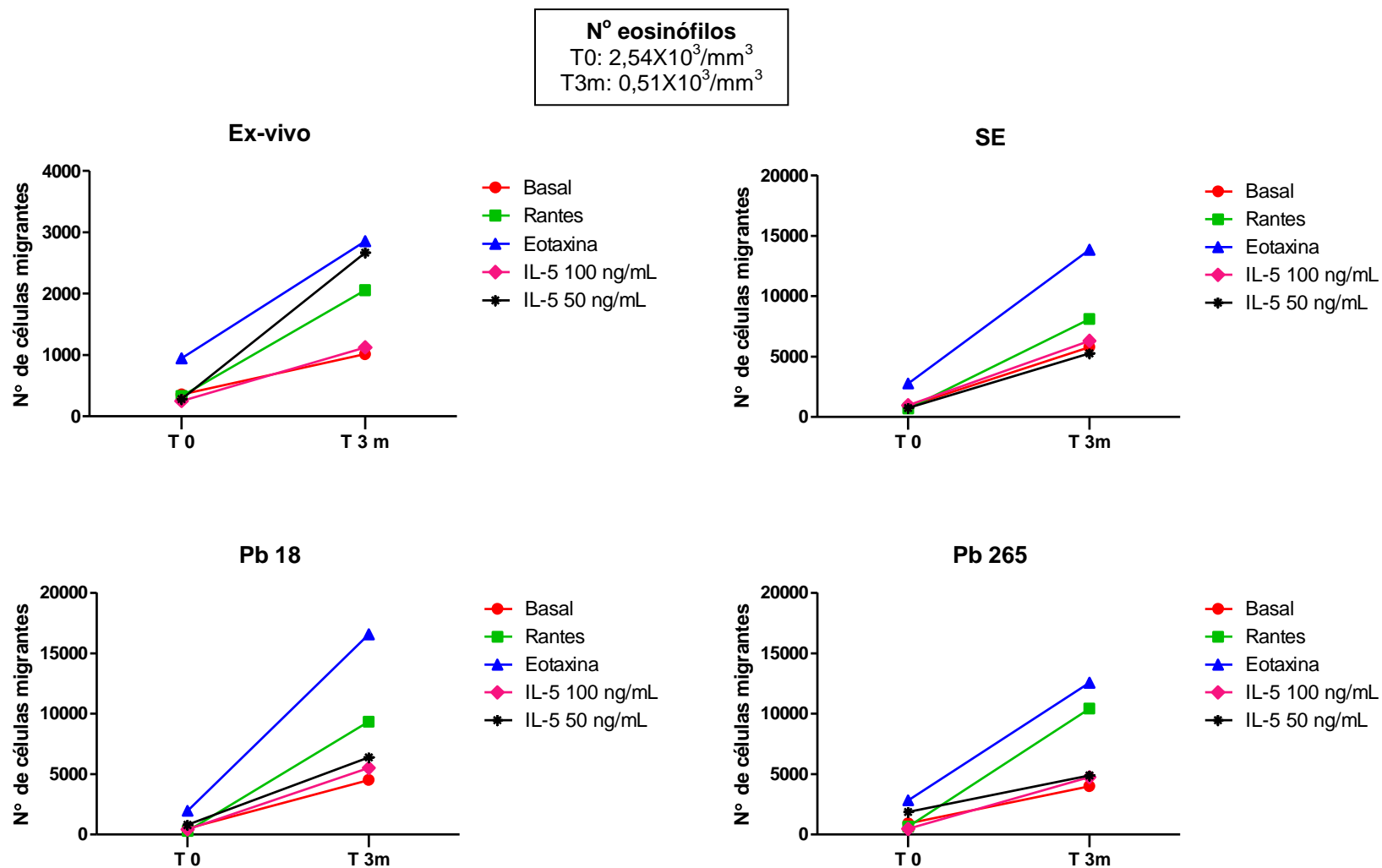


Figura 6- Acompanhamento da resposta quimiotática (Nº de células migrantes) e do número de eosinófilos (inserto) do paciente AMRM. A migração espontânea (basal) e frente a diferentes estímulos (RANTES, eotaxina e IL-5) foi analisada ex-vivo ou após incubação por 4h na ausência (SE) ou presença de leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 ou Pb265), antes (T0) e durante o tratamento antifúngico (3 meses – T3m).

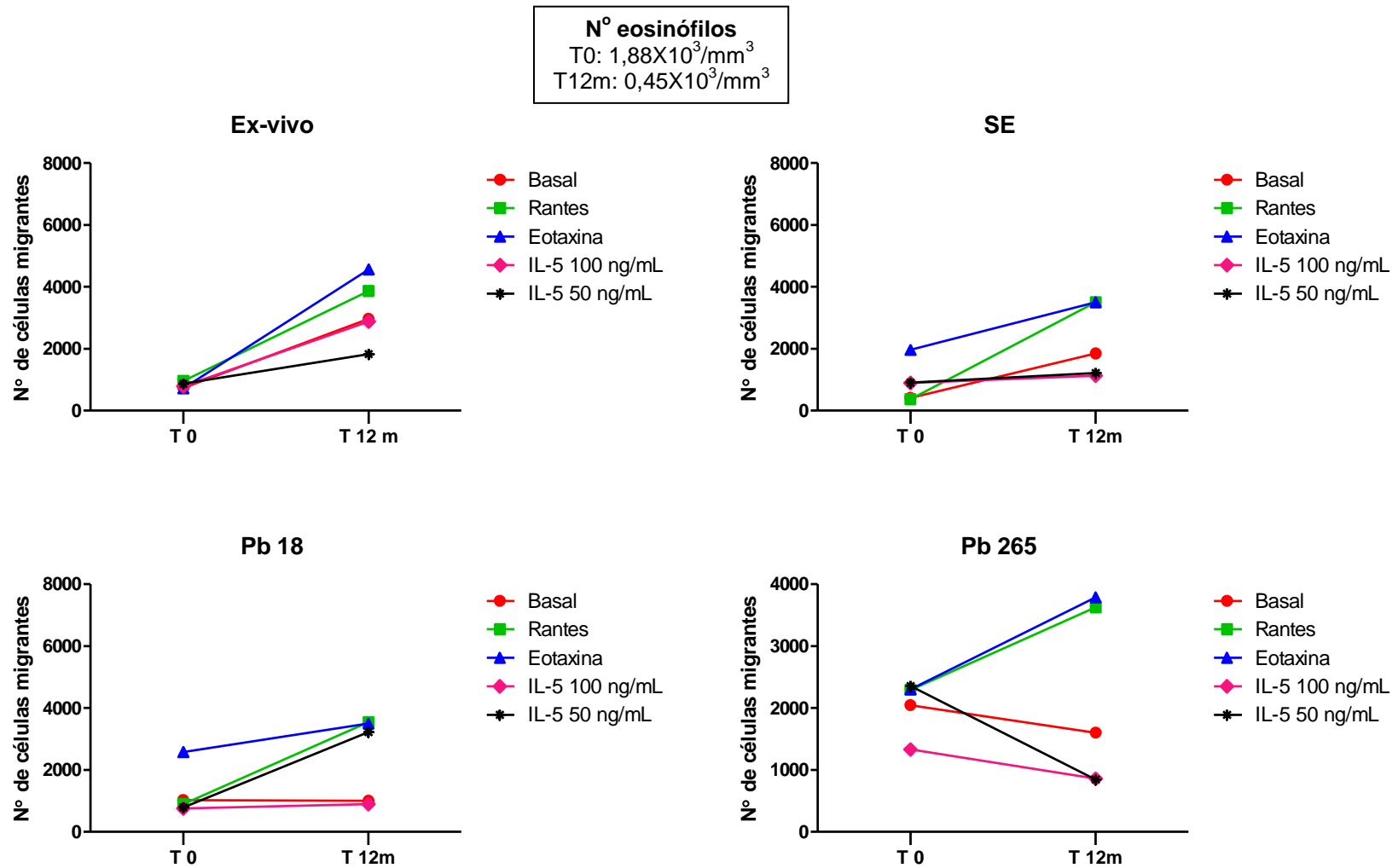


Figura 7- Acompanhamento da resposta quimiotática dos (Nº de células migrantes) e do número de eosinófilos (inserto) do paciente LDS. A migração espontânea (basal) e frente a diferentes estímulos (RANTES, eotaxina e IL-5) foi analisada *ex-vivo* ou após incubação por 4h na ausência (SE) ou presença de leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 ou Pb265), antes (T0) e durante o tratamento antifúngico (12 meses – T12m).

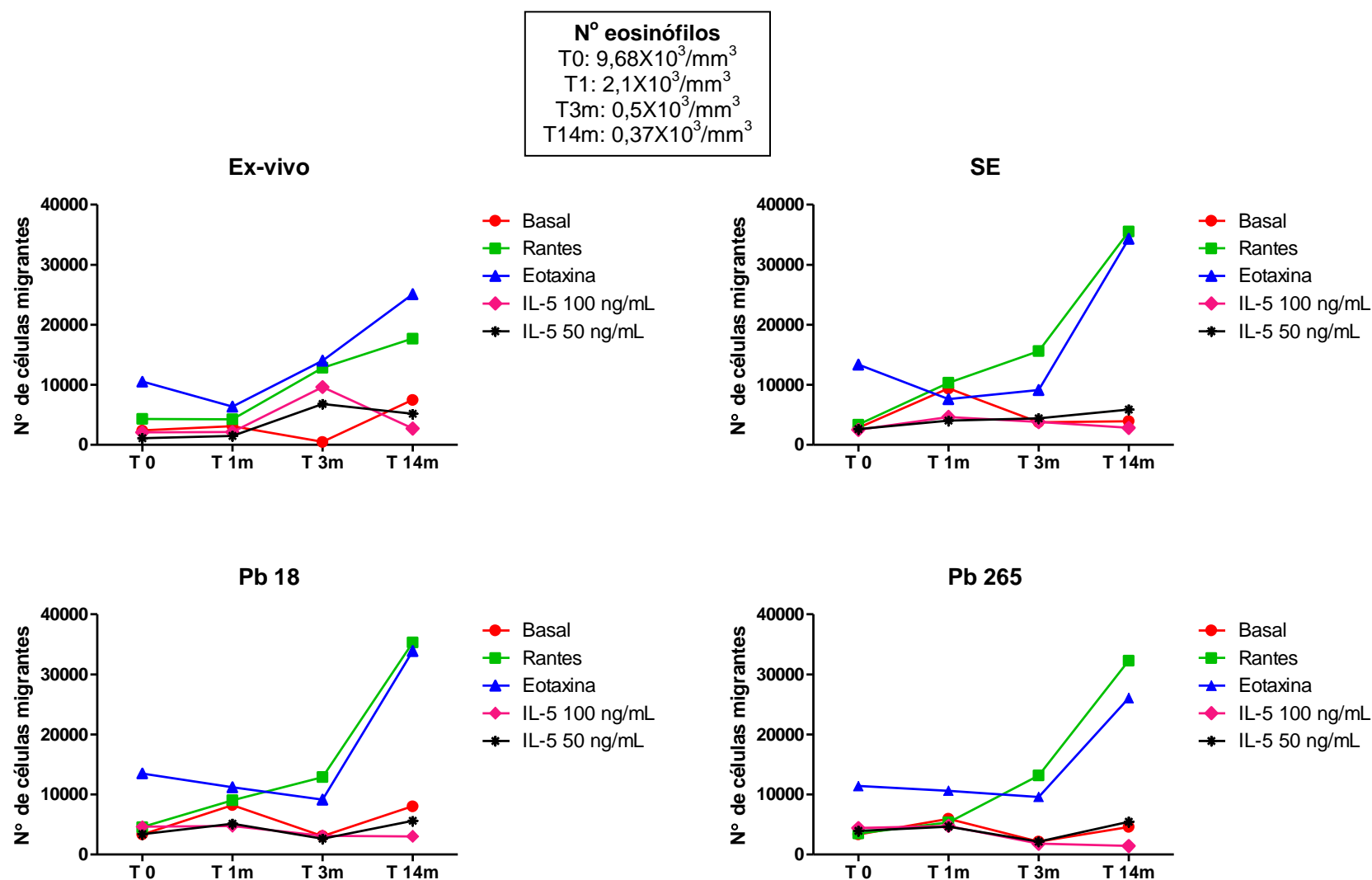


Figura 8. Acompanhamento da resposta quimiotática dos (Nº de células migrantes) e do número de eosinófilos (inserto) do paciente WCPS. A migração espontânea (basal) e frente a diferentes estímulos (RANTES, eotaxina e IL-5) foi analisada *ex-vivo* ou após incubação por 4h na ausência (SE) ou presença de leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 ou Pb265), antes (T0) e em diferentes tempos de tratamento antifúngico (1, 3 e 14 meses – T1m, T3m e T14m, respectivamente).

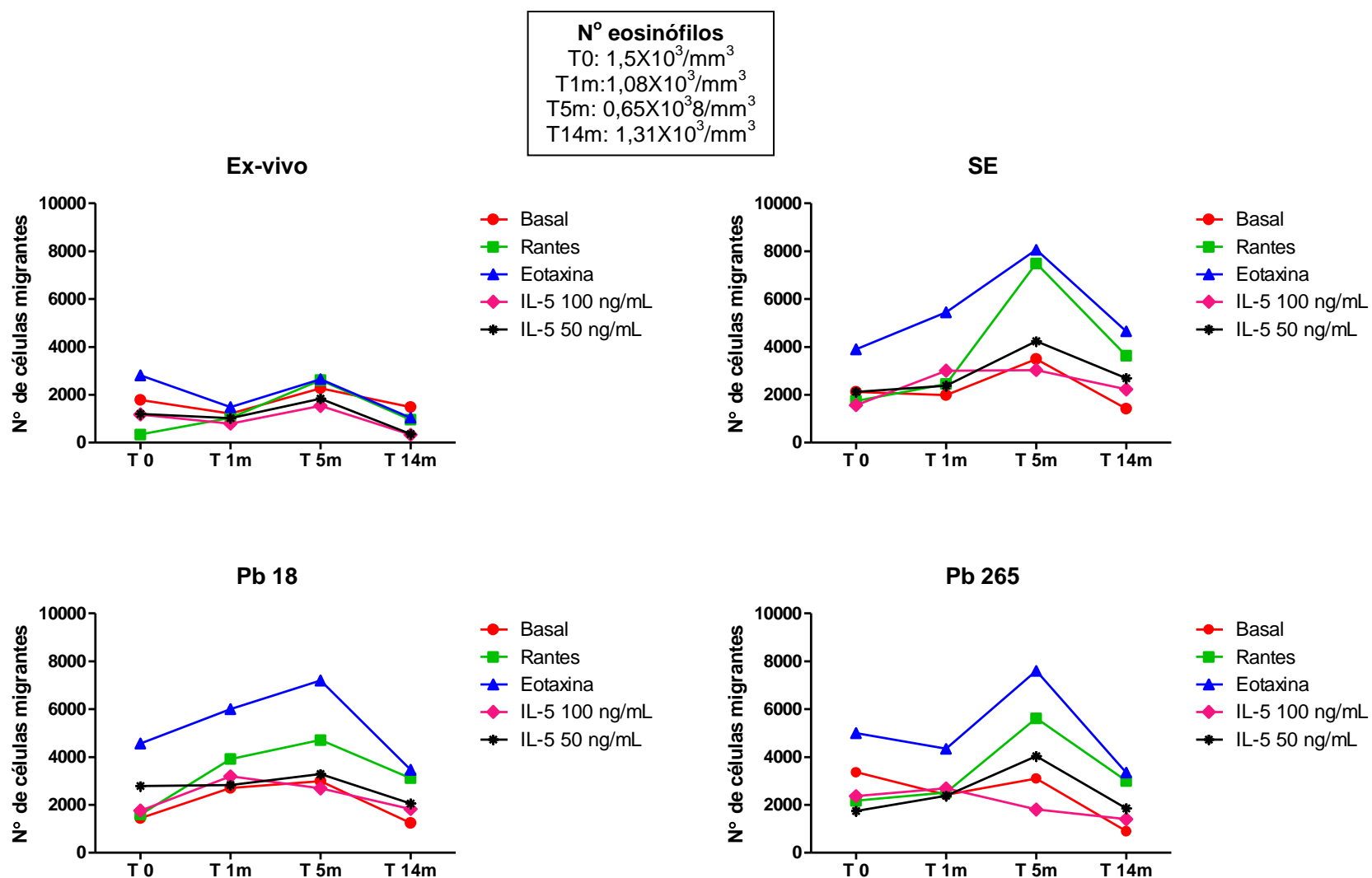


Figura 9- Acompanhamento da resposta quimiotática (Nº de células migrantes) e do número de eosinófilos (inserto) da paciente CSS. A migração espontânea (basal) e frente a diferentes estímulos (RANTES, eotaxina e IL-5) foi analisada *ex-vivo* ou após incubação por 4h na ausência (SE) ou presença de leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 ou Pb265), antes (T0) e durante o tratamento antifúngico (1, 5 e 14 meses - T1m, T5m e T14m, respectivamente).

6. Adesão dos eosinófilos do sangue periférico de pacientes com a forma juvenil da PCM e de indivíduos saudáveis a células endoteliais pulmonares humanas

A regulação da expressão das moléculas de adesão é muito importante no controle da inflamação, sendo a adesão dos leucócitos às células endoteliais constitui a primeira etapa do recrutamento dessas células para o sítio inflamatório. Os eosinófilos expressam numerosas moléculas de adesão como o LFA-1 e Mac-1 que interagem com as células endoteliais via ICAM-1(85). O TNF- α promove o aumento da expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais (96,102).

Para verificar a capacidade de adesão de eosinófilos de pacientes com PCM e controles foram utilizadas células endoteliais pulmonares humanas (HLECs).

Verificamos que, de maneira geral, os eosinófilos dos pacientes possuem maior capacidade de adesão às HLECs do que os controles, quando pré-estimulados por 30 minutos com eotaxina e IL-5 (100 ng/mL) (Figura 10). O tratamento das HLECs com TNF- α não resultou em maior adesão no modelo estudado (Figura 10).

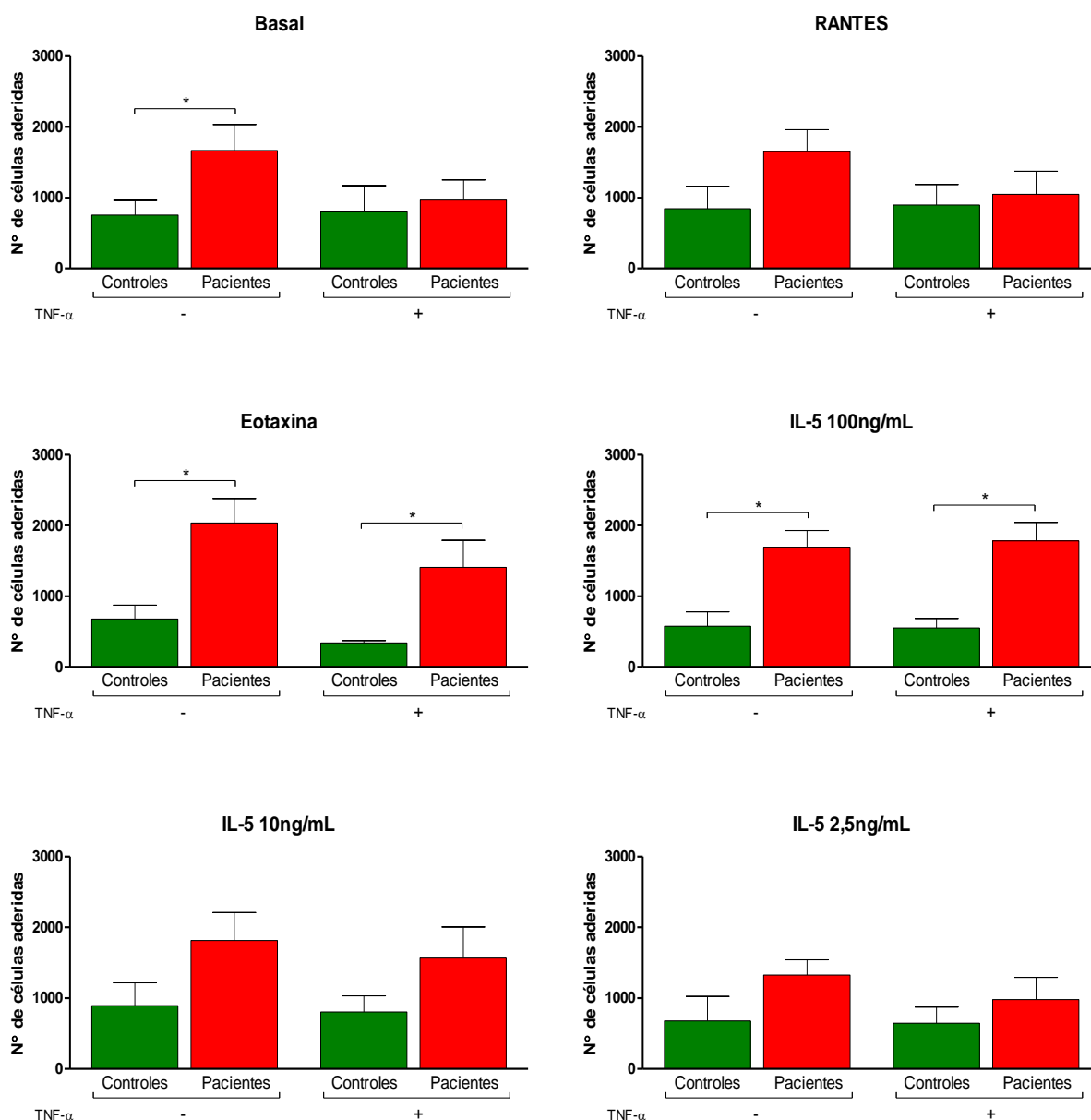


Figura 10: Número de eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM (n=5) e indivíduos saudáveis (controles, n=6) aderidos às células endoteliais pulmonares humanas (HLECs). Os eosinófilos foram pré-incubados durante 30 minutos com meio de cultura (basal) ou RANTES (100ng/mL) ou eotaxina (100ng/mL) ou IL-5 (100, 10 e 2,5ng/mL) antes da incubação com as HLECs por 1h com os mesmos estímulos. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Teste estatístico: Teste t Student. * $P \leq 0,05$.

7. Produção de peróxido de hidrogênio por eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM e doadores sadios (controles)

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por eosinófilos é um evento da resposta inflamatória. Um dos mecanismos fungicidas mais eficientes na PCM é a secreção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico por macrófagos ativados (78,103).

Com o intuito de avaliar a capacidade de produzir peróxido de hidrogênio, eosinófilos dos pacientes com a FJ da PCM e controles foram incubados com leveduras Pb18 e Pb265 e estimulados com IL-5 recombinante (2,5 e 10ng/mL).

Como pode ser visualizado na figura 11, os eosinófilos dos pacientes produzem uma maior quantidade de peróxido de hidrogênio na presença de leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265), quando comparados ao grupo controle, embora as diferenças não fossem estatisticamente significantes. diferença estatística, os, principalmente quando estimulados com as leveduras de alta virulência (Pb18). A adição de IL-5 não induziu mudanças significativas na resposta de produção de H₂O₂ em nenhum dos grupos (Figura 12).

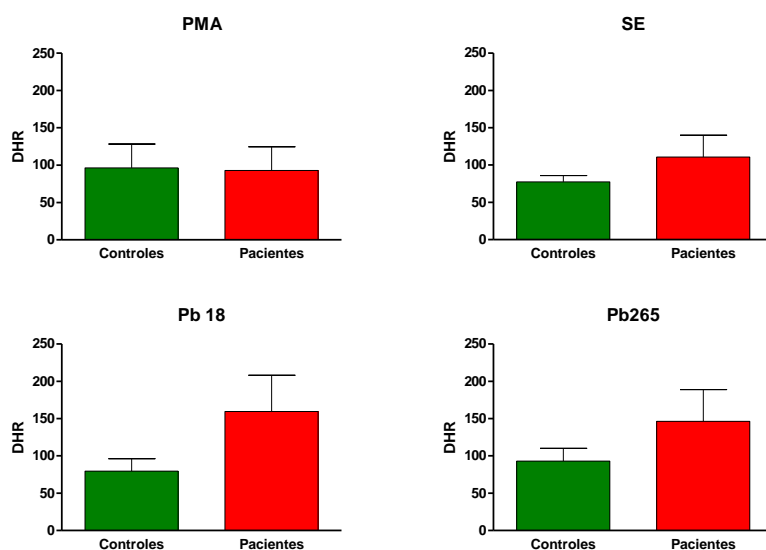


Figura 11: Produção de peróxido de hidrogênio (avaliada pela produção de dihidrorodamina-1,2,3 - DHR) por eosinófilos de pacientes com a FJ da PCM (n=5) e controles (n=4) incubados durante 4h sem estímulo (SE) ou estimulados com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 ou Pb265). Resultados expressos como média \pm EPM.

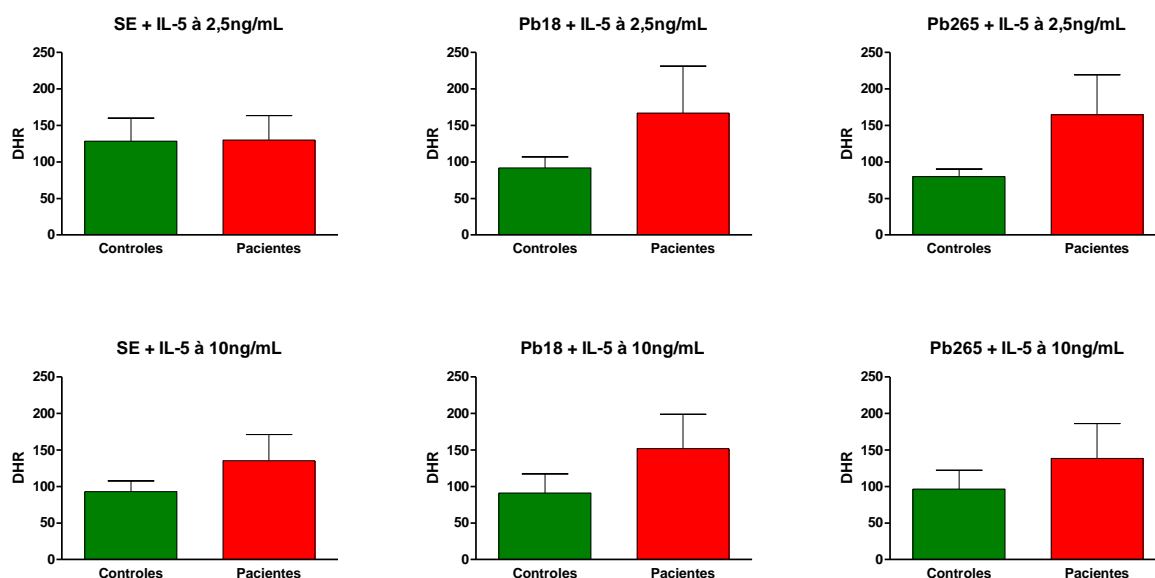


Figura 12: Produção de peróxido de hidrogênio (avaliada pela produção de dihidrorodamina-1,2,3 - DHR) por eosinófilos de pacientes com a FJ da PCM (N=5) e controles (N=4) incubados durante 4h sem estímulo (SE) ou estimulados com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 ou Pb265) e incubados com IL-5 (2,5 ou 10 ng/mL). Resultados expressos como média \pm EPM.

8. Avaliação da atividade fungicida direta dos eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM e de indivíduos saudáveis sobre leveduras de *P. brasiliensis*

Para avaliar se eosinófilos de pacientes ou controles tem a capacidade de matar células fúngicas por contato direto, os eosinófilos foram cultivados por 4 horas com as leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 ou Pb265). Também analisamos o efeito da IL-5 na atividade fungicida direta dos eosinófilos.

Tanto os eosinófilos dos doadores sadios como o dos pacientes com a forma juvenil da PCM foram capazes matar diretamente as leveduras de *P. brasiliensis*, como pode ser constatado pela diminuição do número de unidades formadoras de colônias/mL (CFU/mL) para a cepa de alta virulência Pb18 (Figuras 13 e 14). No entanto, apenas os eosinófilos dos indivíduos do grupo controle apresentaram atividade citotóxica direta contra a cepa de baixa virulência (Pb265) (Figura 13).

Leveduras de alta virulência (Pb18) foram mais suscetíveis à atividade fungicida dos eosinófilos do que as Pb265 (Figuras 13 e 14).

A adição da IL-5 na concentração de 25 ng/mL resultou em aumento da capacidade fungicida dos eosinófilos contra leveduras Pb18 apenas no grupo controle (Figuras 13).

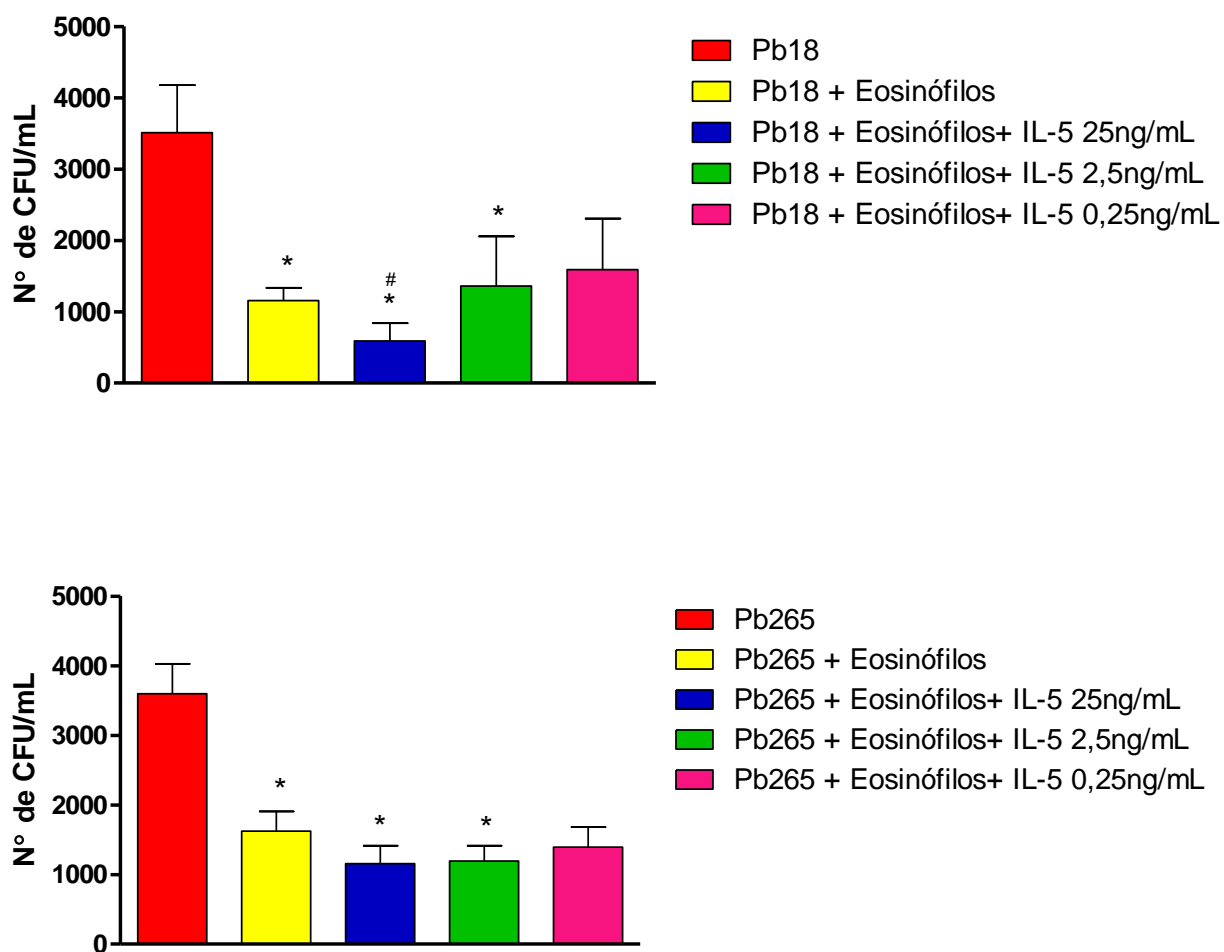


Figura 13: Número de CFUs/mL a partir de sobrenadante obtido após cultura de 4 horas de células leveduriformes das cepas Pb18 ou Pb265 de *P. brasiliensis* na presença ou não de eosinófilos de **doadores sadios** (relação leveduras:eosinófilos - 1:100) e IL-5 em diferentes concentrações. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao Nº de CFUs de leveduras cultivadas na ausência de eosinófilos; # $p < 0,05$ em relação ao Nº de CFUs de leveduras Pb18 cultivadas na presença de eosinófilos.

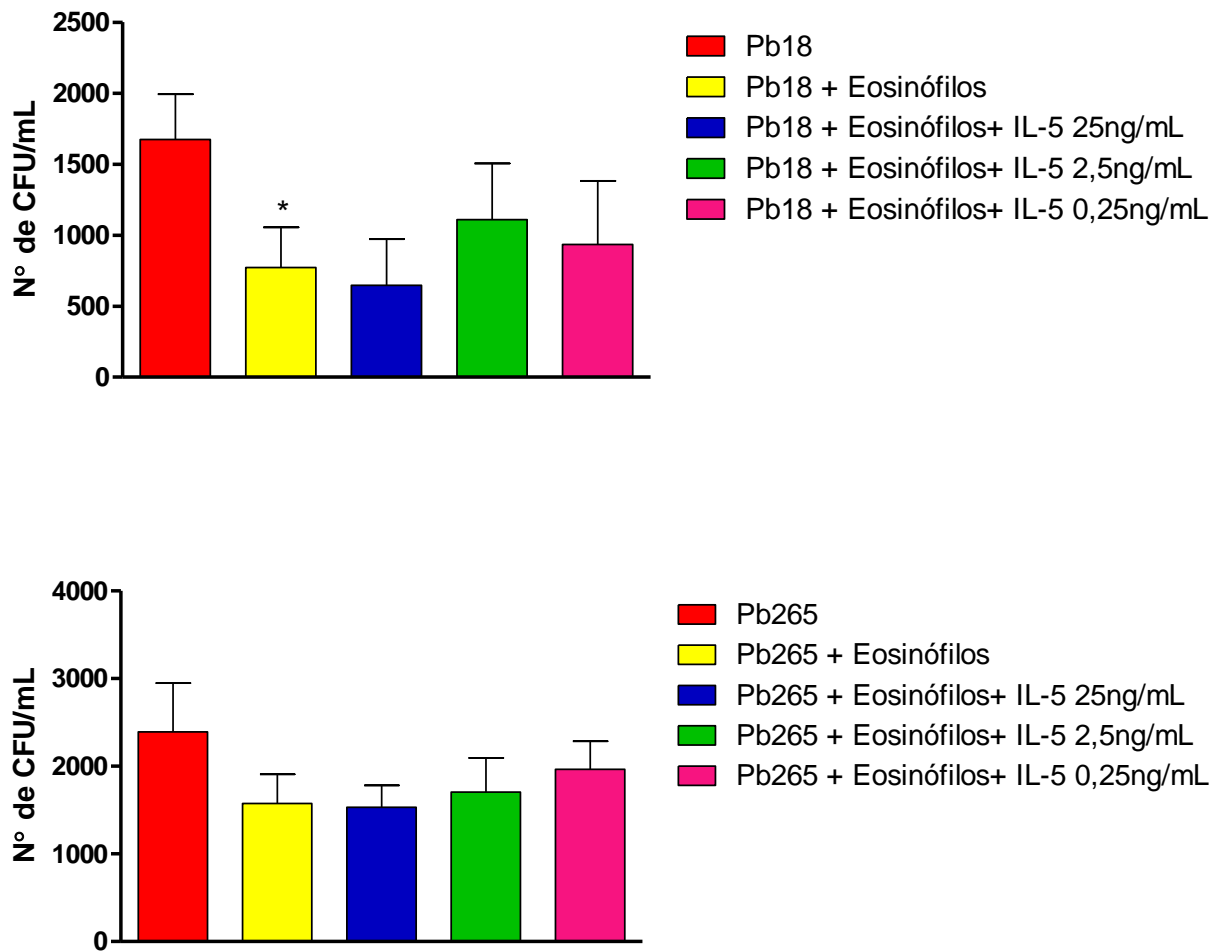


Figura 14: Número de CFUs/mL a partir de sobrenadante obtido após cultura de 4 horas de células leveduriformes das cepas Pb18 ou Pb265 de *P. brasiliensis* na presença ou não de eosinófilos de **pacientes com a forma juvenil da PCM** (relação leveduras:eosinófilos - 1:100) e IL-5 em diferentes concentrações. Resultados expressos como média \pm EPM. teste t * $p < 0,05$ em relação ao Nº de CFUs de leveduras cultivadas na ausência de eosinófilos.

9. Expressão gênica de IL-1 β , IL-2, IL-4, CXCL8, CCL5, MBP, EPO, ECP e EDN por eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM e controles

Os eosinófilos podem efetivamente apresentar antígenos solúveis aos linfócitos T CD4⁺, promovendo a proliferação e polarização de células T (36,104). Além disso, são capazes de secretar citocinas que promovem a polarização Th1 e Th2 (104-106). Em nosso estudo verificamos a expressão gênica de citocinas e quimiocinas envolvidas na resposta ao *P. brasiliensis*. Encontramos diferenças significativas quanto a expressão do RNAm para IL-1 β , IL-2 e IL-4, sendo maior nas células dos pacientes quando estimulados com a levedura Pb18 (cepa de alta virulência), também nas condições ex-vivo para IL-1 β e após 4h de cultura sem estimulação para IL-4, quando comparado aos controles (Figura15).

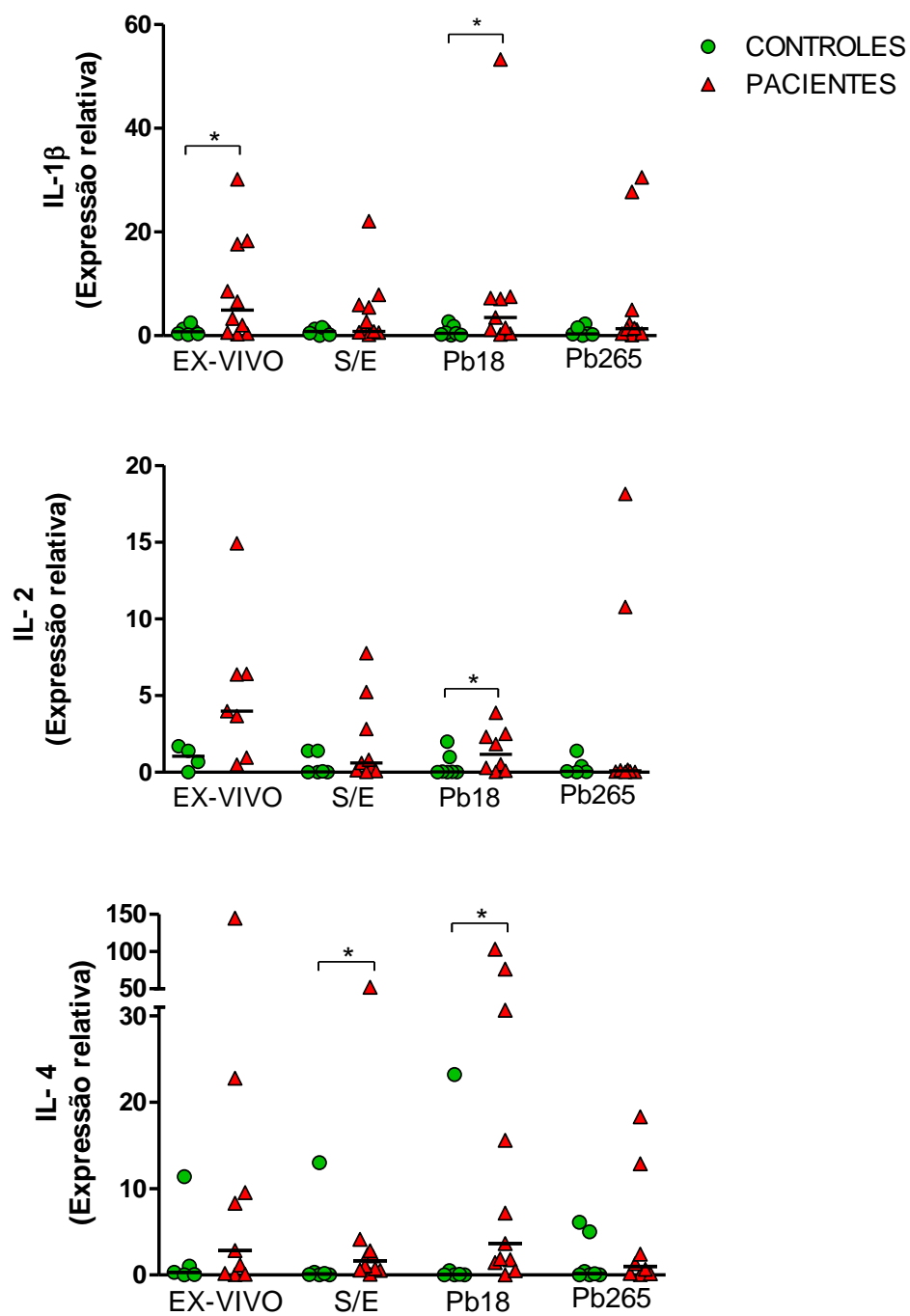


Figura 15: Expressão relativa do RNAm de IL-1 β , IL-2 e IL-4 em eosinófilos do sangue periférico de pacientes com a forma juvenil da PCM (n=10) e indivíduos saudáveis (controles, n=6), ex-vivo e após incubação por 4h na ausência (SE) ou presença de leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 ou Pb265). As barras horizontais representam a mediana. Teste estatístico: Mann Whitney. * p ≤ 0,05.

Dentre as quimiocinas avaliadas, observamos maior expressão do RNAm para CCL5 nos pacientes em relação aos controles em todas as condições e para CXCL8/IL-8 após cultura de 4h (Figura 16).

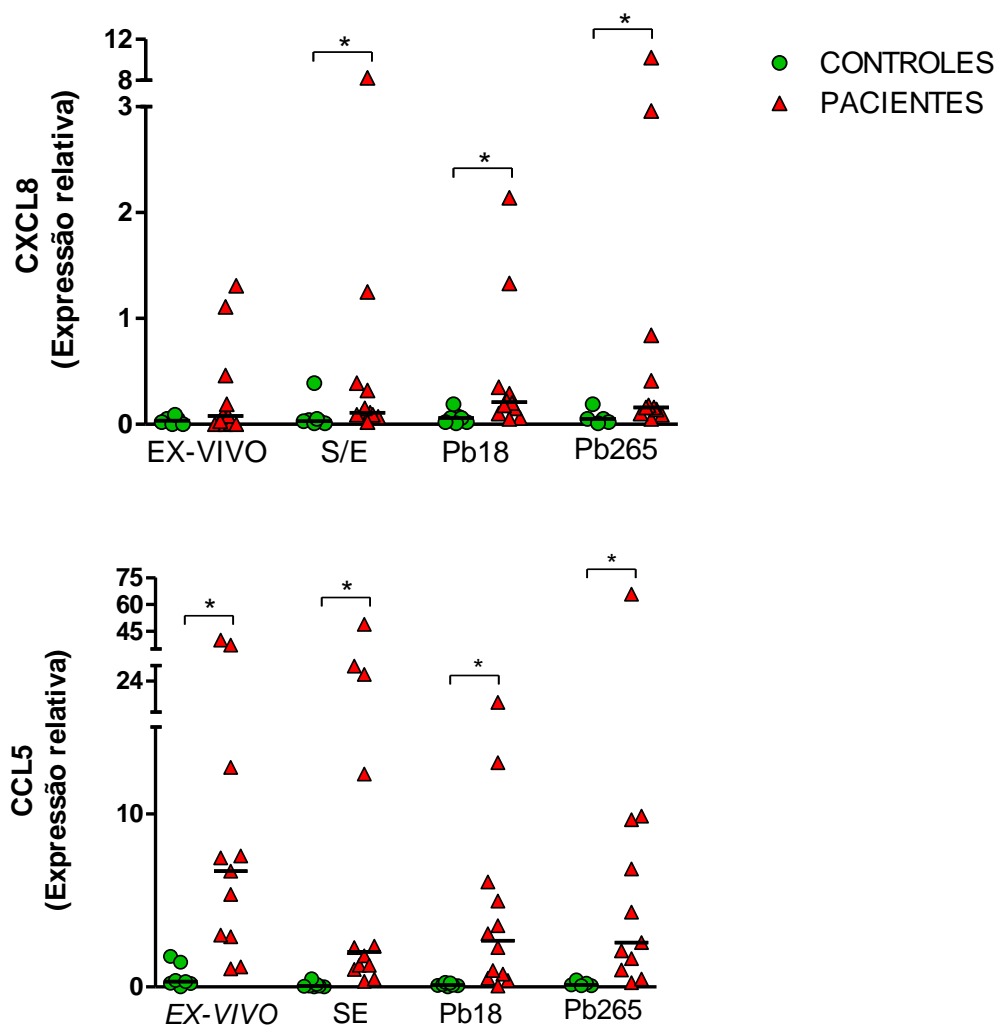


Figura 16: Expressão relativa do RNAm de CXCL8 e CCL5 em eosinófilos do sangue periférico de pacientes com a forma juvenil da PCM (n=10) e indivíduos saudáveis (controles, n=6), *ex-vivo* e após incubação por 4h na ausência (SE) ou presença de leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 ou Pb265). As barras horizontais representam a mediana. Teste estatístico: Mann Whitney. * $p \leq 0,05$.

A produção e liberação das proteínas dos grânulos dos eosinófilos no meio extracelular pode resultar na morte de microrganismos (62,85). A concentração sérica dos produtos dos grânulos citotóxicos dos eosinófilos de pacientes com a FJ da PCM foi maior quando comparado aos doadores saudáveis (Figura 1). Entretanto, como representado na figura 17, a expressão do RNAm das RNases ECP e EDN foi menor nos pacientes do que nos controles quando as culturas que foram incubadas com ambas as leveduras do *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265). Por outro lado, não foram encontradas diferenças significativas em relação aos grânulos MBP e EPO (figura 17)

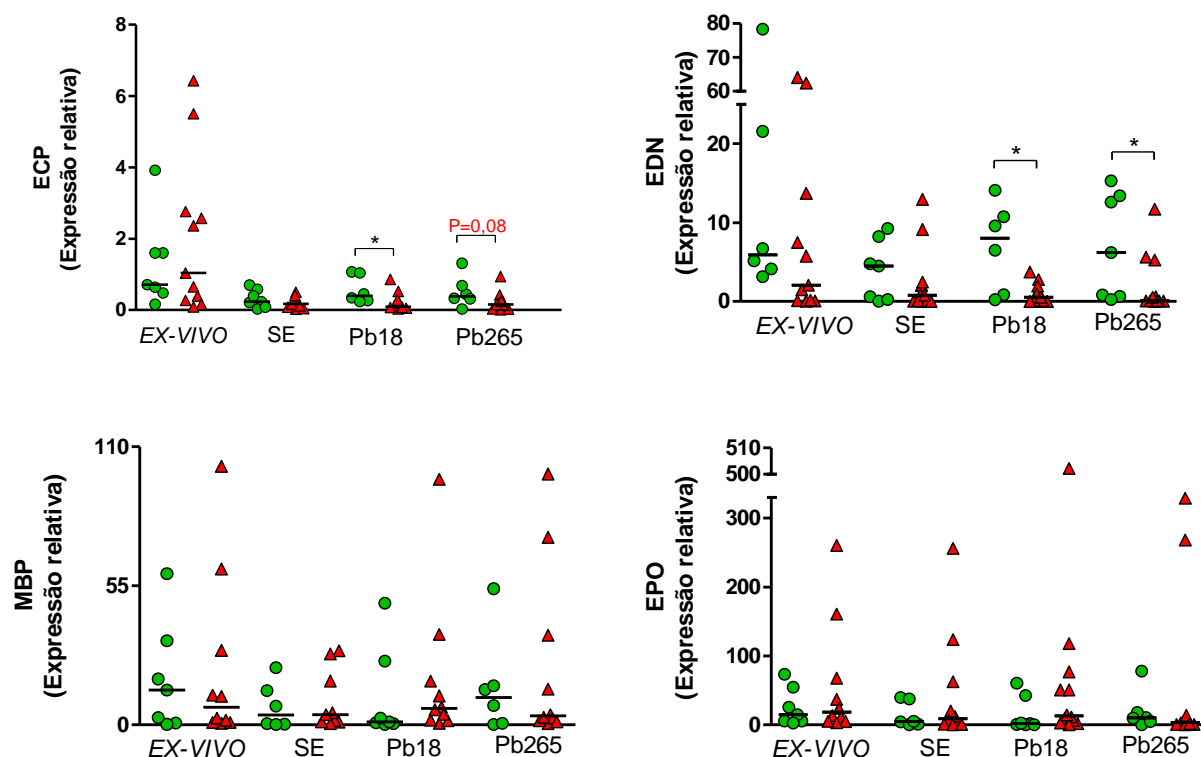


Figura 17: Expressão relativa do RNAm de ECP, EDN, MBP e EPO em eosinófilos do sangue periférico de pacientes com a forma juvenil da PCM (n=10) e indivíduos saudáveis (controles, n=6), ex-vivo e após incubação por 4h na ausência (SE) ou presença de leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 ou Pb265). As barras horizontais representam a mediana. Teste estatístico: Mann Whitney. * $p \leq 0,05$.

10. Expressão IL-25 e IDO em linfonodos e fígado de pacientes com a forma juvenil da PCM

A forma juvenil da PCM é caracterizada por uma resposta imune do tipo Th2 (10,14,16,17). A indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) e a IL-25 promovem a proliferação de linfócitos do perfil Th2 (53,80,81).

Biópsias de fígado e linfonodos de pacientes com a forma juvenil da PCM foram avaliadas por IHQ para detecção de IL-25 e IDO. Em ambos os tecidos foi observada intensa marcação tanto para IL-25 como para IDO (Figuras 18 e 19)

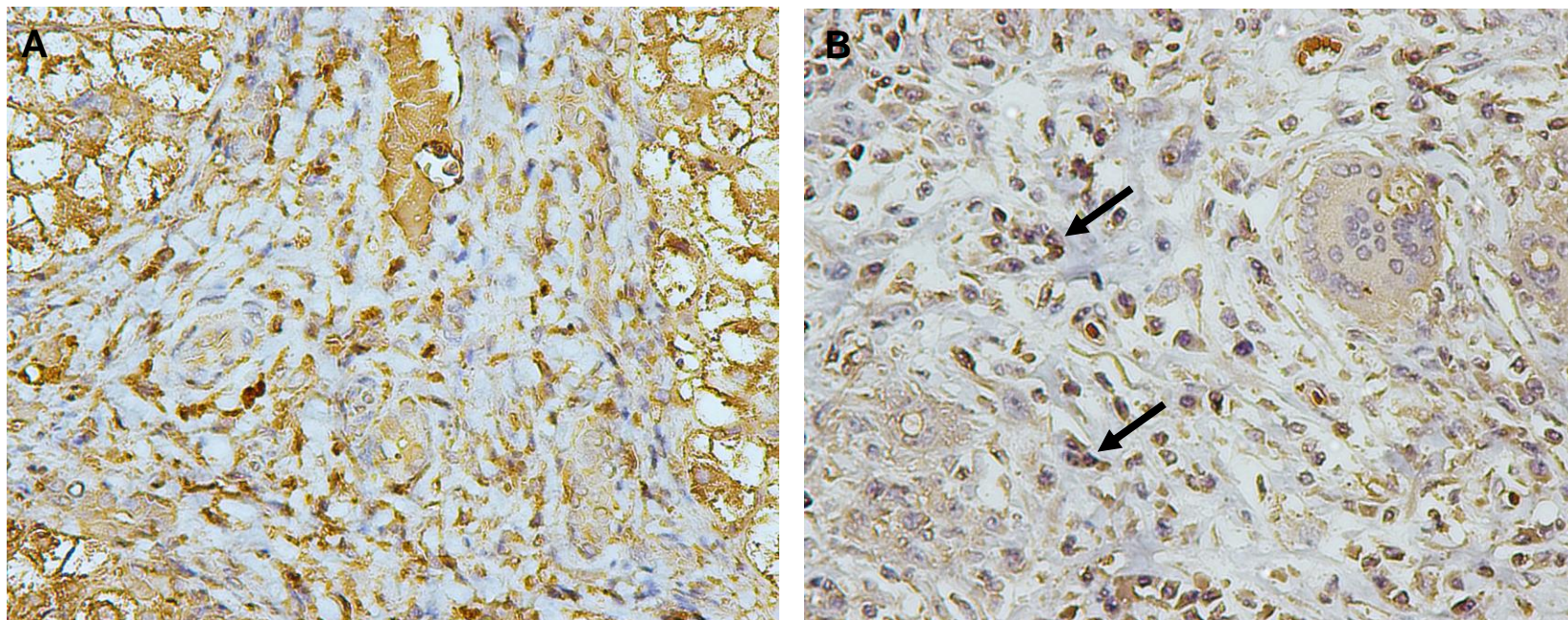


Figura 18: Expressão de IL-25 no fígado (A) e linfonodo (B) de pacientes com a forma juvenil da PCM. Observa-se no fígado marcação difusa da IL-25 no citoplasma de hepatócitos, células do estroma e inflamatórias, mas também no meio extracelular (A), no linfonodo, há marcação extracelular difusa e, mais intensa no citoplasma de eosinófilos (setas) (B). (400X)

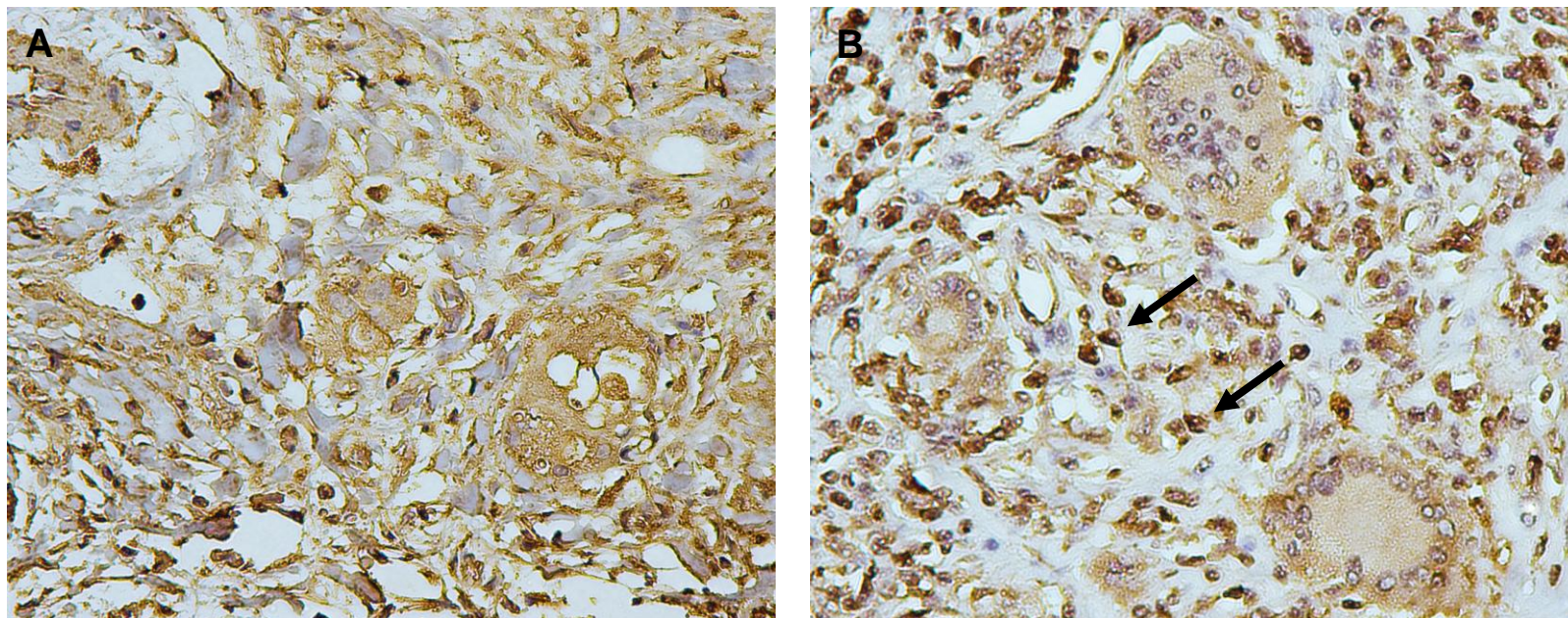


Figura 19: Imuno-expressão difusa de IDO intra e extracelular no fígado (A) e linfonodo (B). No linfonodo notar macrófagos positivos para IDO (setas) (400X)

11. Expressão de marcadores de superfície em eosinófilos do sangue periférico de pacientes com a forma juvenil da PCM e indivíduos saudáveis

Como mencionado, os eosinófilos são leucócitos multifuncionais que podem estar envolvidos em vários processos inflamatórios e quando ativados podem produzir citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e mediadores lipídicos, além da liberação do conteúdo dos seus grânulos citotóxicos. Os eosinófilos também são capazes de reconhecer, processar e apresentar antígenos (35,36,85,107).

Analizamos a expressão de moléculas relacionadas às funções de reconhecimento e apresentação de antígenos pela técnica de citometria de fluxo em eosinófilos do sangue periférico de pacientes com a forma juvenil da PCM e indivíduos saudáveis (controles). Além da avaliação *ex-vivo*, os eosinófilos foram examinados após cultura de 4 horas na presença ou não de leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265).

A frequência de eosinófilos CD80⁺ é menor em pacientes com PCM em relação aos controles nas condições *ex-vivo*, 4h sem estímulo e após estímulo com Pb18, enquanto não foram observadas diferenças significativas em relação à frequência de células CD86⁺ (Figura 20).

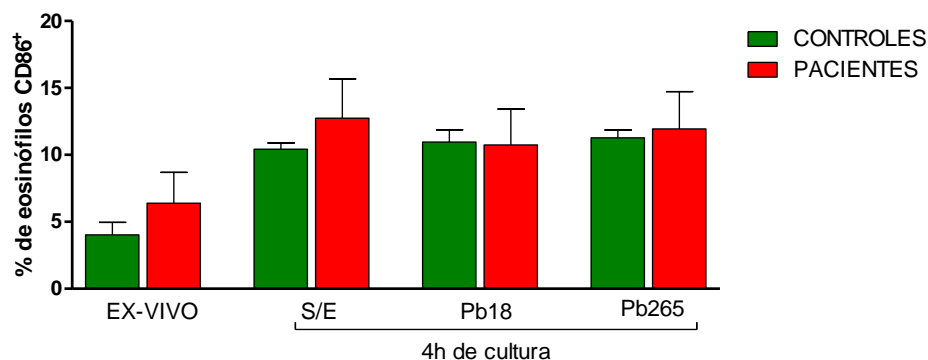
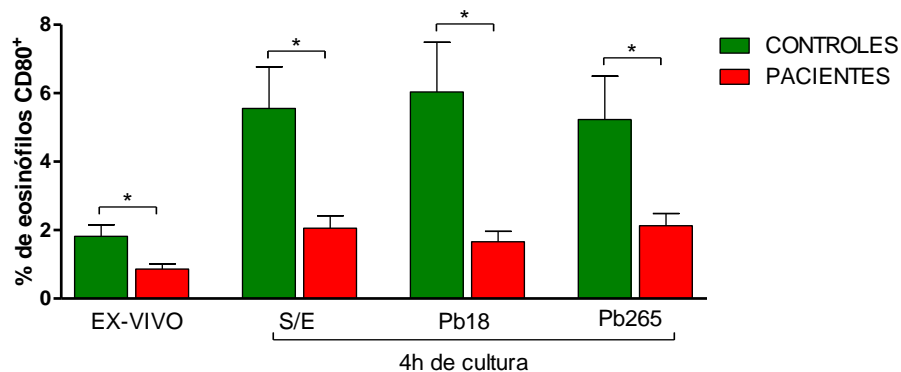


Figura 20: Frequência de eosinófilos positivos para as moléculas coestimulatórias CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2). Os eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM (n=12) e de indivíduos do grupo controle (n=8) foram analisados *ex-vivo* e após incubação por 4h sem estímulo (SE) ou estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:100). As barras representam a média \pm EPM. Teste estatístico t *Student*. * $p \leq 0,05$.

A porcentagem de eosinófilos positivos para a molécula de MHC de classe II e TLR4 foi menor nos pacientes com PCM do que no grupo controle nas culturas de 4h com e sem o estímulo de leveduras Pb18 e Pb265 (Figura 21). Por outro lado, a frequência de células TLR-2⁺ foi maior nos pacientes em todas as condições analisadas, embora diferença significativa tenha sido observada apenas na condição *ex-vivo* (Figura 21).

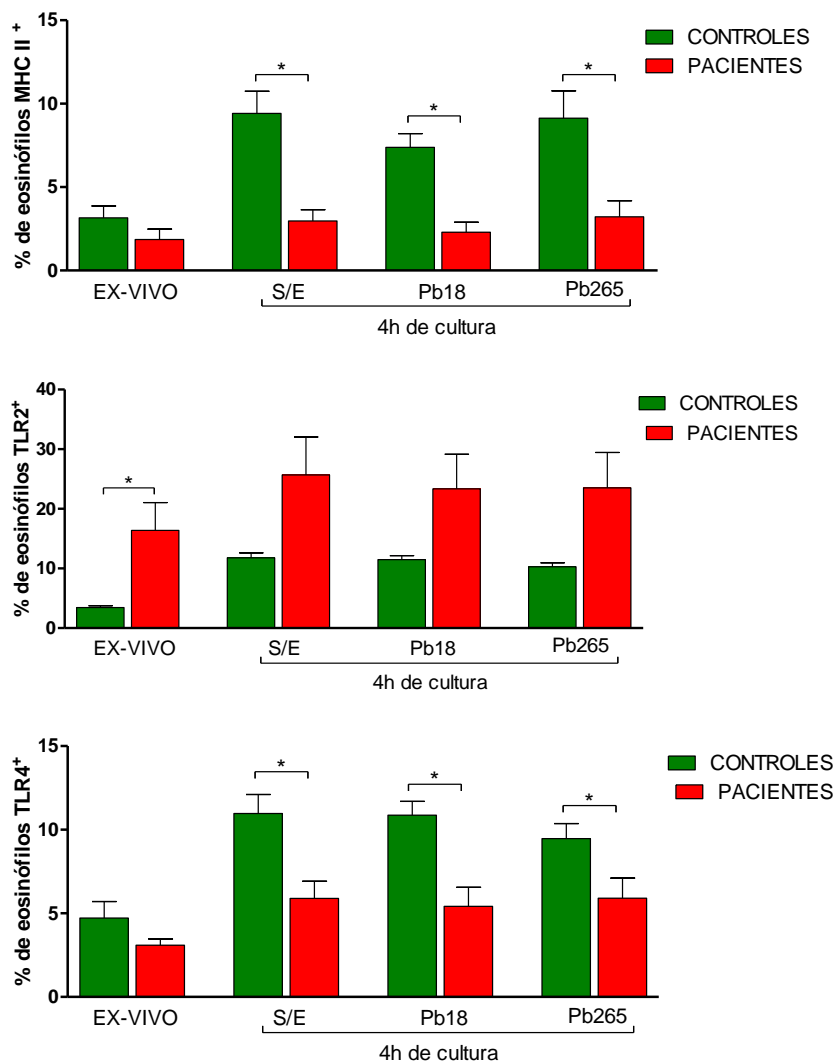


Figura 21: Frequência de eosinófilos positivos para as moléculas de reconhecimento antigênico MHC de classe II, TLR-2 e TLR-4. Os eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM (n=12) e de indivíduos do grupo controle (n=8) foram analisados *ex-vivo* e após incubação por 4h sem estímulo (SE) ou estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:100). As barras representam a média ± EPM. Teste estatístico t *Student*. * $p \leq 0,05$.

Em relação aos receptores de IgE observamos uma frequência reduzida do CD23 nos eosinófilos dos pacientes em todas as condições (Figura 22). A análise da expressão da molécula $Fc\epsilon R1\alpha$ mostrou uma grande heterogeneidade não permitindo detectar diferenças significantes entre pacientes e controles (Figura 22).

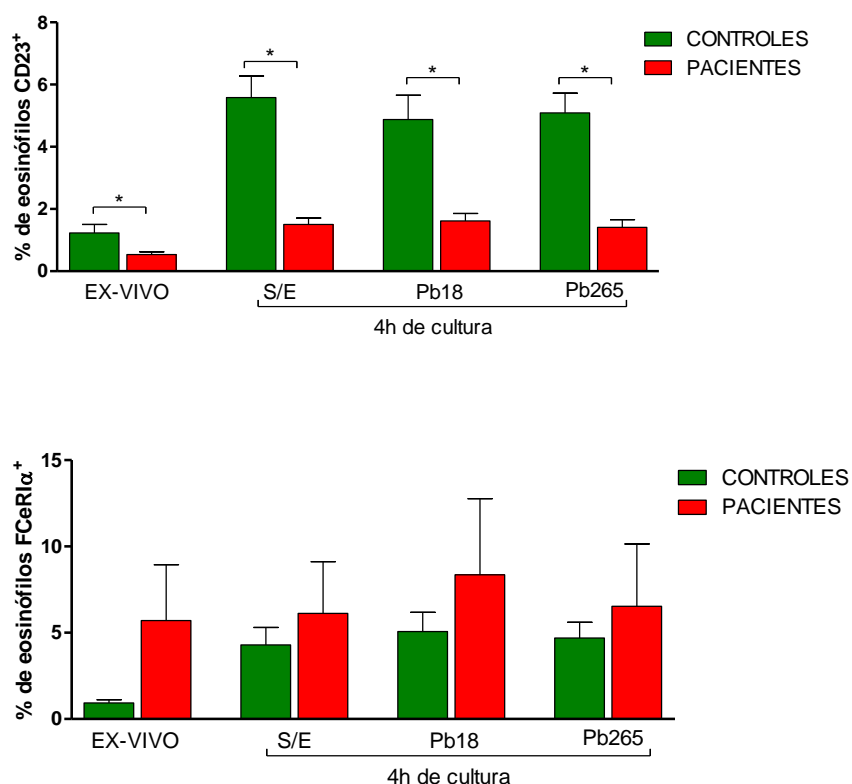


Figura 22: Frequência de eosinófilos positivos para os receptores de IgE, CD23 e $Fc\epsilon R1\alpha$. Os eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM (n=12) e de indivíduos do grupo controle (n=8) foram analisados *ex-vivo* e após incubação por 4h sem estímulo (SE) ou estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:100). As barras representam a média \pm EPM. Teste estatístico t *Student*. * $p \leq 0,05$.

A análise da expressão das moléculas de adesão CD11a (LFA-1) foi menor nos pacientes com PCM após cultura de 4h com ou sem estímulo com leveduras de *P. brasiliensis* (Figura 23). Diferentemente, a expressão de CD54 (ICAM-1) mostrou-se muito heterogênea, sem diferença entre pacientes e controles (Figura 23).

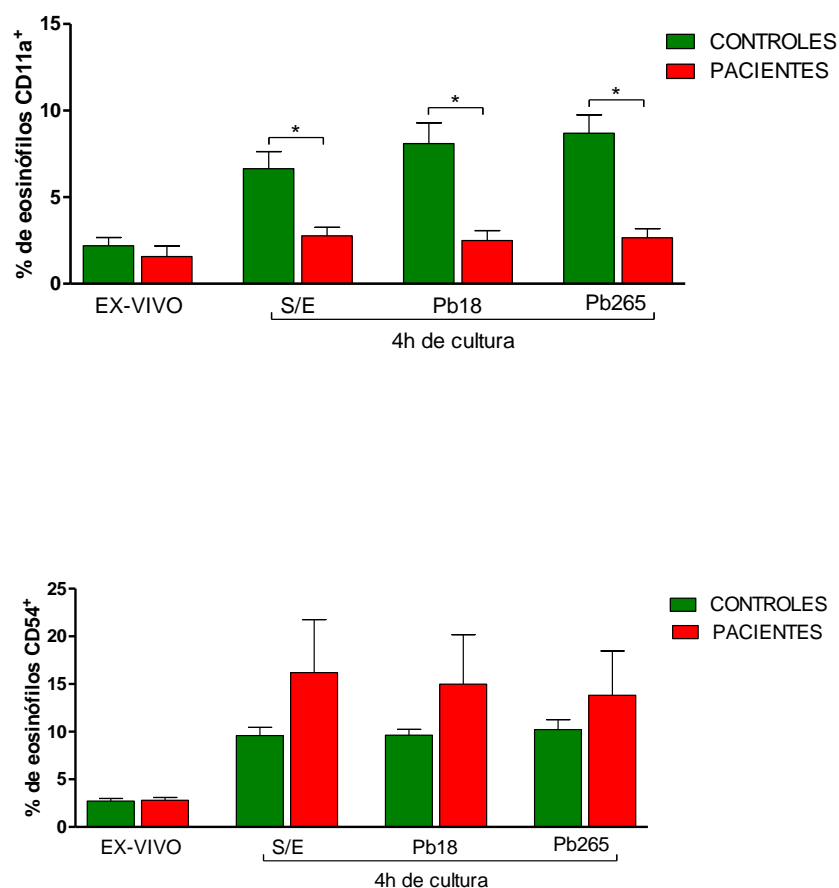


Figura 23: Frequência de eosinófilos positivos para moléculas de adesão LFA-1 (CD11a/CD18) e ICAM-1 (CD54). Os eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM (n=12) e de indivíduos do grupo controle (n=8) foram analisados *ex-vivo* e após incubação por 4h sem estímulo (SE) ou estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:100). As barras representam a média ± EPM. Teste estatístico *t Student*. * $p \leq 0,05$.

A frequência de células CD11b+ e CD49d+ foi semelhante e bastante elevada (95 – 100%) em eosinófilos de pacientes e controles (dados não mostrados). Tendo em vista o fato de serem moléculas constitutivas e altamente expressas, fizemos a análise da intensidade média de fluorescência (IMF) que avalia o número de moléculas por célula.

A IMF de CD11b foi maior nos eosinófilos de pacientes após cultura de 4 horas, tanto na ausência, como na presença de leveduras de *P. brasiliensis*. Por outro lado, a IMF de CD49d mostrou-se significativamente mais elevada em pacientes apenas após estimulação com leveduras Pb18 (Figura 24)

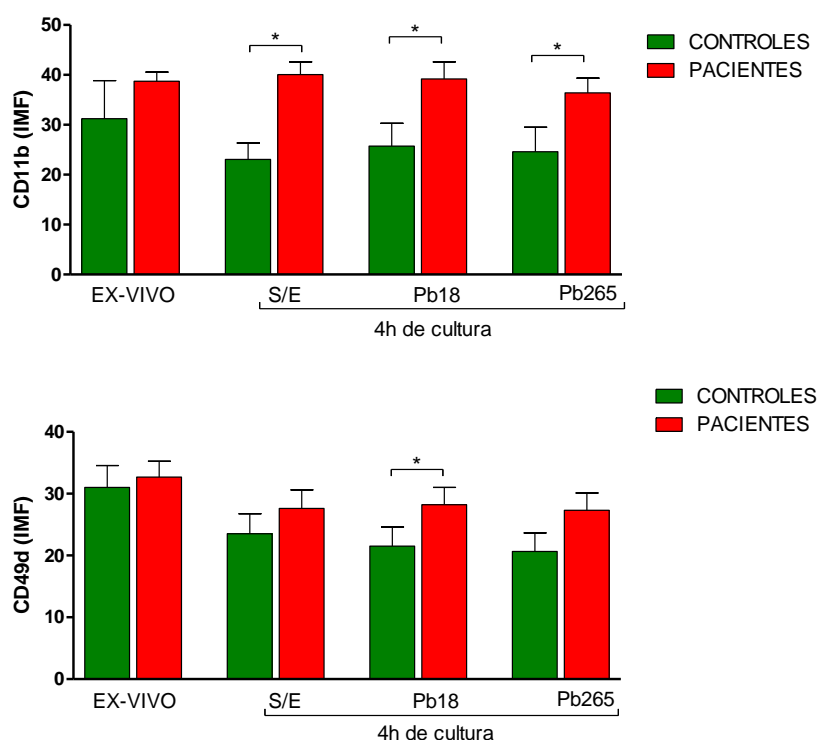


Figura 24: Intensidade média de fluorescência (IMF) de CD11b e CD49d de eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM (n=12) e de indivíduos do grupo controle (n=8) analisados *ex-vivo* e após incubação por 4h sem estímulo (SE) ou estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:100). As barras representam a média ± EPM. Teste estatístico *t Student*. * $p \leq 0,05$.

Os eosinófilos são células que respondem seletivamente à quimiocina eotaxina, sendo o CCR3 o seu receptor (83). Pacientes com PCM possuem uma porcentagem menor de células CCR3⁺ comparado aos controles nas culturas estimuladas com as leveduras Pb18 e Pb265. No entanto, essas células estão mais ativadas como demonstrado pela maior frequência do marcador de ativação celular CD69 nos pacientes comparado aos indivíduos saudáveis (Figura 25).

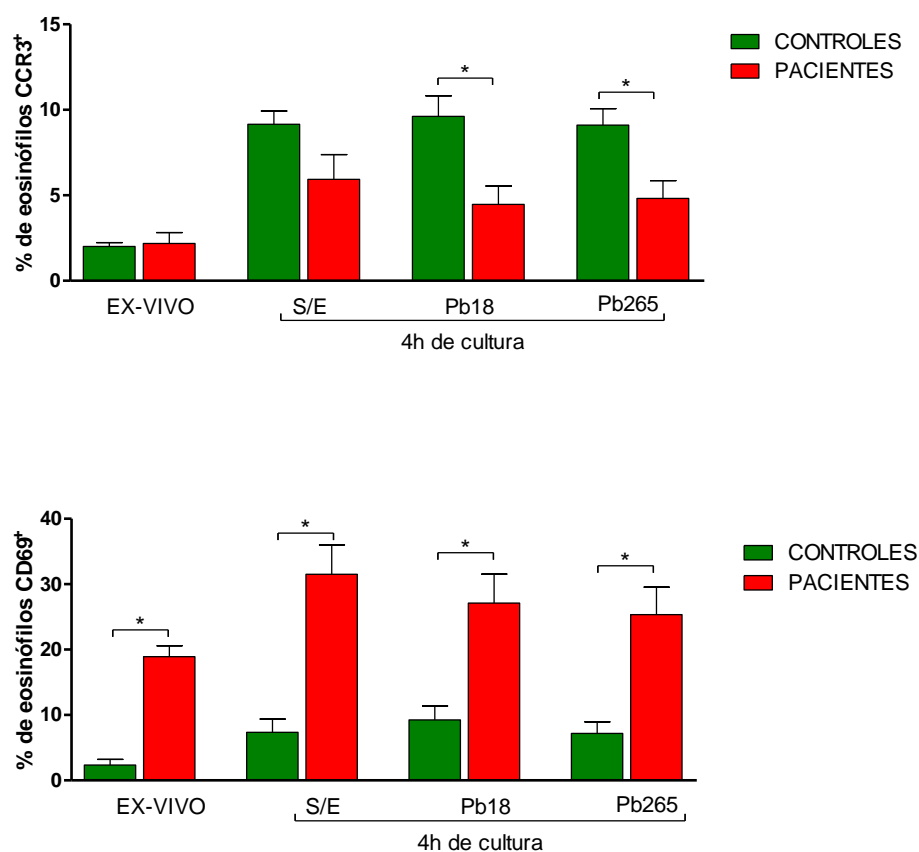


Figura 25: Frequência de eosinófilos positivos para o receptor de eotaxina (CCR3) e o marcador de ativação celular (CD69). Os eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM (n=12) e de indivíduos do grupo controle (n=8) foram analisados *ex-vivo* e após incubação por 4h sem estímulo (SE) ou estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:100). As barras representam a média ± EPM. Teste estatístico t *Student*. * $p \leq 0,05$.

12. Expressão de marcadores de superfície em eosinófilos do sangue periférico de pacientes durante o tratamento antifúngico

A expressão de moléculas de superfície de eosinófilos em pacientes com PCM se altera durante o tratamento antifúngico como pode ser visualizado nas figuras 26 - 31.

De maneira geral a expressão dos receptores de reconhecimento e apresentação de antígenos (CD80, CD86, MHC de classe II e TLR-2); do receptor de IgE, CD23; das moléculas de adesão CD11a, CD11b, CD49d e CD54; e do receptor de eotaxina CCR3 diminui ao longo do tratamento (Figuras 26 -31), acompanhando a redução do número de eosinófilos no sangue periférico e de outros marcadores avaliados como título de anticorpos anti-*P. brasiliensis* e concentração sérica de PCR.

Diante do exposto, observamos que no início da doença existe uma maior frequência de eosinófilos expressando moléculas capazes de promover o reconhecimento e apresentação de antígenos, além de moléculas relacionadas a adesão e migração para os sítios inflamatórios. Entretanto, ao final do tratamento antifúngico a frequência de células positivas para essas moléculas encontra-se reduzida.

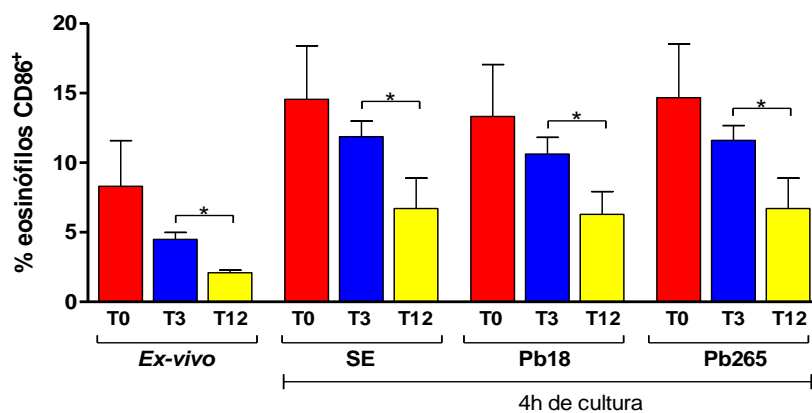
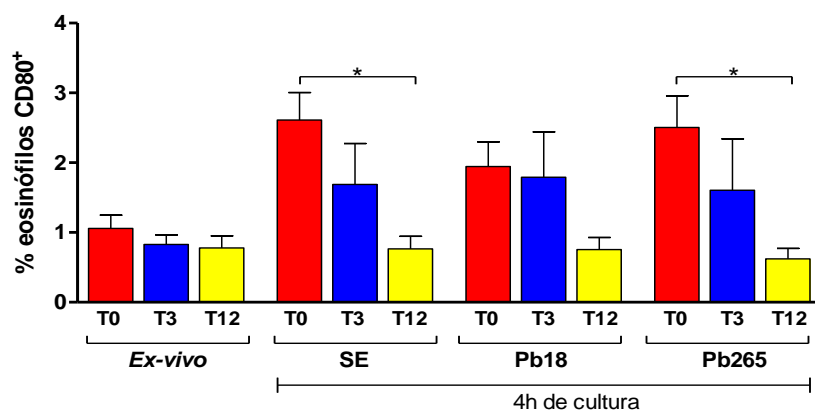


Figura 26: Frequência de eosinófilos positivos para as moléculas coestimulatórias CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) em pacientes com a forma juvenil da PCM (n=8) antes (T0) e durante o tratamento antifúngico (T3 – 3 meses e T12 – 12 a 14 meses). Os eosinófilos foram analisados *ex-vivo* e após incubação por 4h sem estímulo (SE) ou estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:100). As barras representam a média ± EPM. Teste estatístico *t Student*. * $p \leq 0,05$.

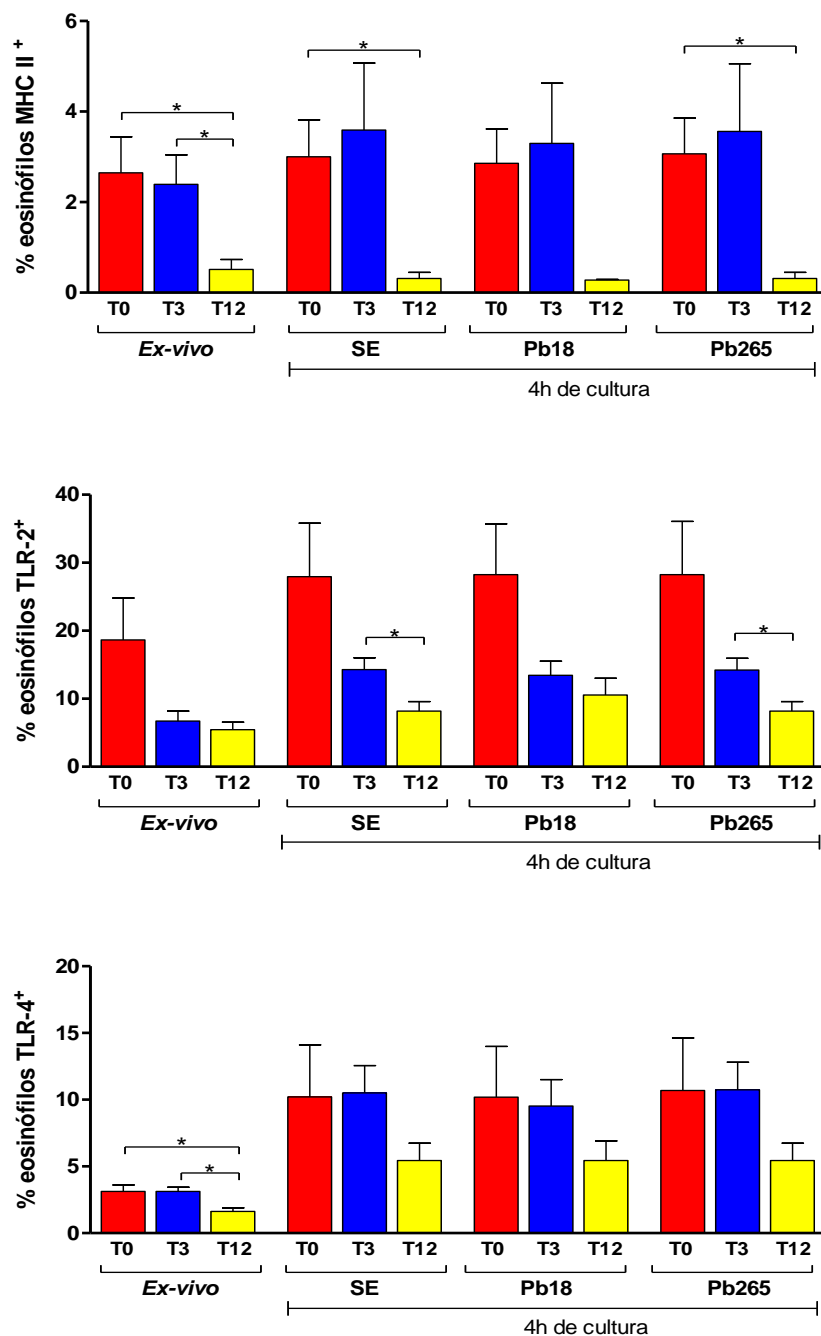


Figura 27: Frequência de eosinófilos positivos para as moléculas de reconhecimento antigênico MHC de classe II, TLR-2 e TLR-4 em pacientes com a FJ da PCM (n=8) antes (T0) e durante o tratamento antifúngico (T3 – 3 meses e T12 – 12 a 14 meses). Os eosinófilos foram analisados *ex-vivo* e após incubação por 4h sem estímulo (SE) ou estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:100). As barras representam a média ± EPM. Teste estatístico t *Student*. * $p \leq 0,05$.

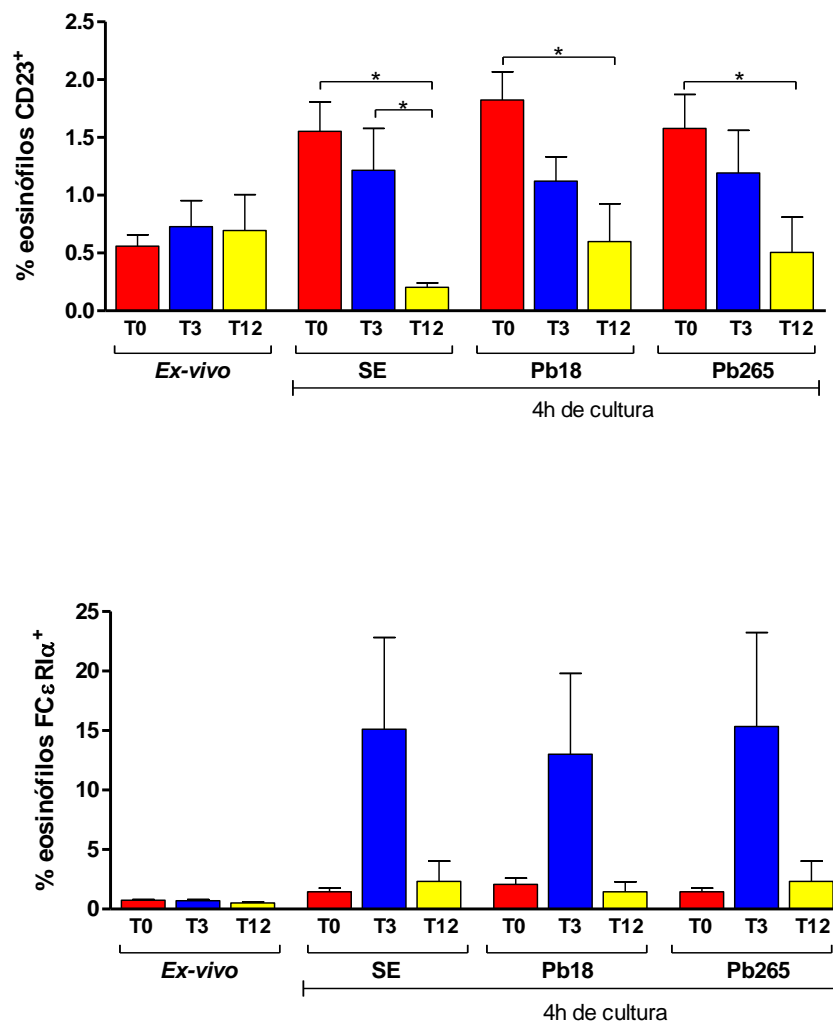


Figura 28: Frequência de eosinófilos positivos para os receptores de IgE, CD23 e FcεRIα em pacientes com a FJ da PCM (n=8) antes (T0) e durante o tratamento antifúngico (T3 – 3 meses e T12 – 12 a 14 meses). Os eosinófilos foram analisados *ex-vivo* e após incubação por 4h sem estímulo (SE) ou estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:100). As barras representam a média ± EPM. Teste estatístico t Student. * $p \leq 0,05$.

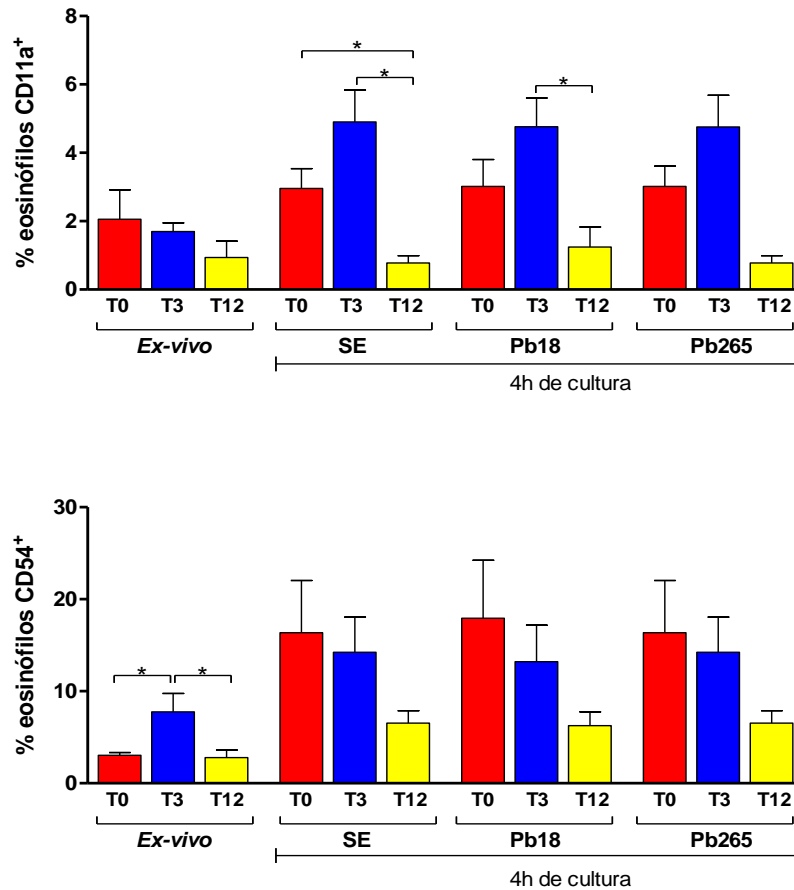


Figura 29: Frequência de eosinófilos positivos para moléculas de adesão LFA-1 (CD11a/CD18) e ICAM-1 (CD54) em pacientes com a FJ da PCM (n=8) antes (T0) e durante o tratamento antifúngico (T3 – 3 meses e T12 – 12 a 14 meses). Os eosinófilos foram analisados *ex-vivo* e após incubação por 4h sem estímulo (SE) ou estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:100). As barras representam a média \pm EPM. Teste estatístico t *Student*. * $p \leq 0,05$.

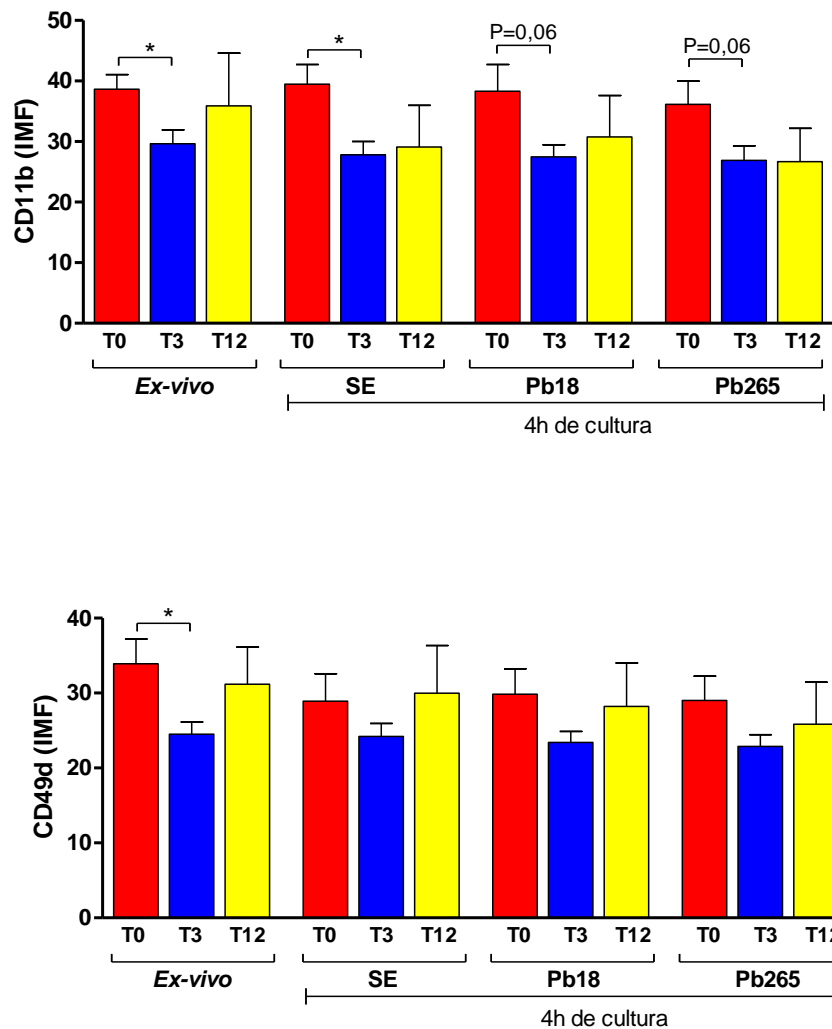


Figura 30: Intensidade média de fluorescência (IMF) de CD11b e CD49d de eosinófilos em pacientes com a FJ da PCM (n=8) antes (T0) e durante o tratamento antifúngico (T3 – 3 meses e T12 – 12 a 14 meses). Os eosinófilos foram analisados *ex-vivo* e após incubação por 4h sem estímulo (SE) ou estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:100). As barras representam a média \pm EPM. Teste estatístico t *Student*. * $p \leq 0,05$.

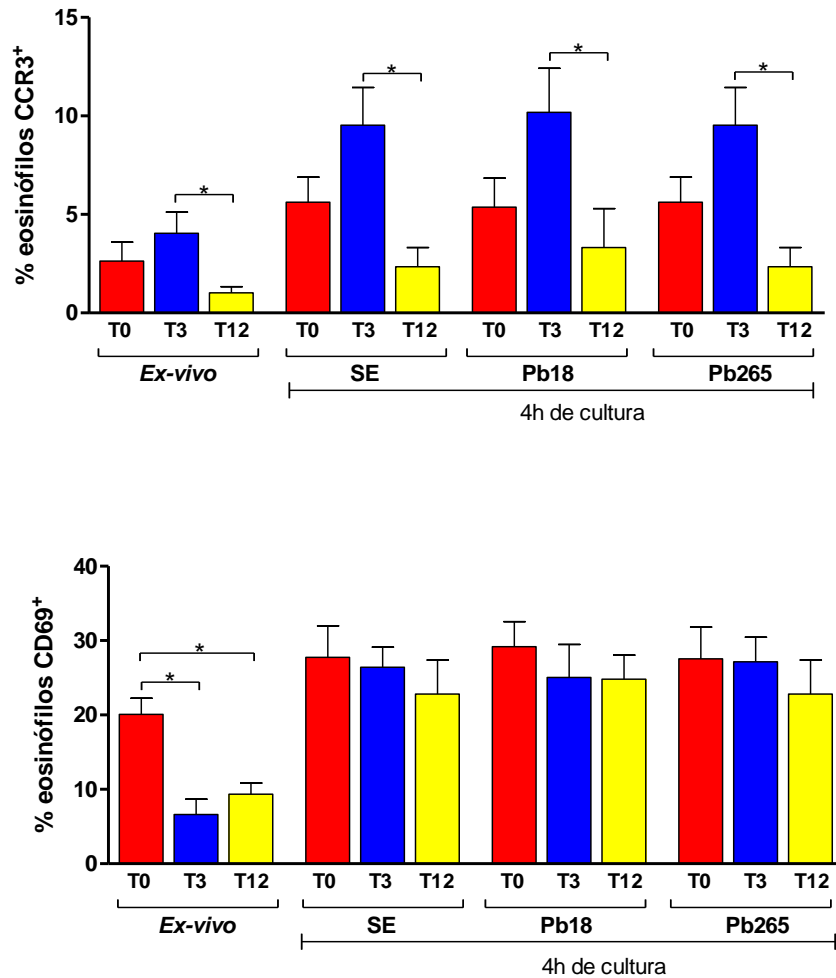


Figura 31: Frequência de eosinófilos positivos para o receptor de eotaxina (CCR3) e o marcador de ativação celular (CD69) em pacientes com a FJ da PCM (n=8) antes (T0) e durante o tratamento antifúngico (T3 – 3 meses e T12 – 12 a 14 meses). Os eosinófilos foram analisados *ex-vivo* e após incubação por 4h sem estímulo (SE) ou estimuladas com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 – razão 1:100). As barras representam a média \pm EPM. Teste estatístico t *Student*. * $p \leq 0,05$.

DISCUSSÃO

A eosinofilia periférica é um achado comum em pacientes com a forma aguda ou juvenil da PCM, principalmente em crianças (18,26-29), mas não há estudos sobre o papel dessas células na doença. O objetivo do presente trabalho compreender a função dos eosinófilos na fisiopatologia da PCM, avaliando algumas de suas características fenotípicas e funcionais em pacientes com a forma juvenil da PCM, comparando-as a doadores saudáveis, durante o tratamento antifúngico.

Dentre os 15 pacientes com a forma juvenil da PCM analisados, a proporção de homens e mulheres foi semelhante. A eosinofilia periférica estava presente em 86,7% dos casos, porcentagem maior do que a observada por Pereira e colaboradores (18). Também observamos títulos elevados de anticorpos anti-*P.brasiliensis* e do marcador inflamatório sistêmico, a proteína C reativa.

Dois pacientes (AFM e SCR) apresentaram sorologia negativa para PCM pela técnica de imunodifusão, apesar de biópsia positiva para o fungo. Foi realizado o teste de ELISA que mostrou altos títulos de anticorpos anti-gp43 de *P.brasiliensis* em ambos os soros. Em trabalho anterior mostramos que falta de reatividade no teste de imunodifusão pode ser associada a produção de anticorpos da classe IgG2 com baixa afinidade, dirigidos principalmente contra epítomos de carboidrato (108).

Durante o tratamento antifúngico observamos a redução número de eosinófilos do sangue periférico, dado também relatado por outros autores (18,19,27), além da redução da proteína C reativa, e dos títulos de anticorpos anti-*P.brasiliensis*.

Eosinófilos ativados podem produzir algumas quimiocinas como CCL5, CXCL9 e CXCL10 (109-111). As quimiocinas CXCL9 e CXCL10, potencialmente quimiotáticas para linfócitos T ativados, sinalizam por meio de um receptor comum, o CXCR3, expresso por células T de memória (CD45RO⁺), preferencialmente do tipo Th1 e por células NK, mas não por monócitos ou neutrófilos (112-114). Nas inflamações alérgicas, as quimiocinas CC, por exemplo, RANTES (CCL5), promovem a migração e ativação de células inflamatórias,

incluindo os eosinófilos (115,116). Concentrações elevadas de RANTES, CCL2 (MCP-1), CXCL10 e CXCL9 em associação com infiltrado mononuclear foram detectados nos pulmões de camundongos infectados com *P. brasiliensis* (117).

Em nosso estudo detectamos concentrações elevadas das quimiocinas RANTES e CXCL9 no soro dos pacientes com a forma juvenil da PCM comparado aos indivíduos saudáveis, provavelmente um reflexo do processo inflamatório ativo, que diminuía ao longo do tratamento antifúngico. A análise da expressão gênica do RNAm para RANTES corrobora com detecção sistêmica, sendo maior pacientes com a FJ da PCM quando comparado aos indivíduos saudáveis. Esses dados sugerem que os eosinófilos poderiam colaborar na síntese de quimiocinas promotoras do recrutamento de células T efetoras diferenciadas (118).

Como mencionado anteriormente, os eosinófilos possuem papel fundamental nas desordens alérgicas e infecções parasitárias. Nestas doenças os eosinófilos são ativados e há a geração de metabólitos oxidativos e produtos citotóxicos, tais como ânion superóxido, H_2O_2 , EPO, ECP, MBP e EDN (116,119). Além da atividade citotóxica a EDN tem função imunomoduladora sendo capaz de induzir a migração e maturação das células dendríticas favorecendo resposta Th2. Adicionalmente a ECP também possui atividade não citotóxica como supressão da resposta linfoproliferativa de linfócitos T e indução da síntese de imunoglobulinas pelas células B, características da resposta imune da forma juvenil da PCM (85).

Nossos resultados mostraram que os pacientes com a forma juvenil da PCM apresentam concentrações séricas mais elevadas de MBP, EPO, ECP e EDN comparados aos indivíduos saudáveis. Ito e colaboradores (120) relacionaram a liberação de EDN à ativação dos eosinófilos, com consequente aumento na expressão do marcador de ativação, o CD69. Os eosinófilos ativados são capazes de fagocitar microrganismos, mas sua eliminação é dependente da liberação dos grânulos proteicos e da produção espécies reativas de oxigênio (121). Quando recrutados para os tecidos, os eosinófilos em resposta a vários estímulos podem liberar essas proteínas catiônicas. Neste trabalho observamos marcação positiva para MBP próxima a células fúngicas em biópsias de fígado e

de linfonodos, conforme descrito anteriormente (41). Tendo em vista o grande número de eosinófilos que compõem a reação inflamatória no fígado de pacientes com PCM, foi observada uma marcação maior para MBP neste tecido do que em linfonodos dos mesmos pacientes. Diante do exposto, sugerimos que os eosinófilos dos pacientes estão ativados, como demonstrado pela elevada porcentagem de células CD69+ e poderiam liberar o conteúdo dos seus grânulos citotóxicos sobre o fungo, eliminando-o, além de atingir tecidos próximos, causando destruição celular.

A migração dos eosinófilos envolve a interação de três componentes do sistema imune: citocinas que aumentam a produção de quimiocinas e a expressão de moléculas de adesão pelo endotélio; quimiocinas que ativam e atraem os eosinófilos e outras células inflamatórias e moléculas de adesão que permitem a ligação e posterior migração das células do sangue para o sítio inflamatório (85).

A eotaxina contribui para a quimiotaxia seletiva de eosinófilos e migração transendotelial através do receptor CCR3 em respostas mediadas principalmente por $\beta 2$ -integrinas (25,84). Outros estudos mostraram que a eosinofilia pulmonar induzida por alérgenos e a eosinofilia induzida por nematódeos intestinais e nas doenças inflamatórias do intestino são dependentes do receptor CCR3 via eotaxina-1 (122,123). Comparando a capacidade migratória dos eosinófilos dos pacientes antes do tratamento antifúngico com o grupo controle, observamos que a porcentagem de células dos pacientes que migram em relação a eotaxina é praticamente duas vezes maior do que o controle, sendo este o único estímulo ao qual os eosinófilos respondem na fase inicial do tratamento.

Vários mediadores induzem a quimiotaxia de eosinófilos como o fator ativador de plaquetas (PAF) e leucotrienos (LTB₄). Entretanto, quimiocinas como eotaxina e RANTES são mais seletivas para essas células e se ligam ao receptor CCR3 (eotaxina e RANTES) e CCR1 (RANTES). Em nosso estudo detectamos concentrações séricas elevadas de eotaxina e RANTES nos pacientes com a forma juvenil da PCM, que diminuem ao longo do tratamento antifúngico, juntamente com a redução no número de eosinófilos. A expressão do receptor da

eotaxina também reduz com o tratamento antifúngico, resultados que estão de acordo com Kampen e Badewa (124,125). Esses autores sugerem que a expressão do CCR3 pelos eosinófilos pode ser restrita a etapa de ativação e degranulação dos eosinófilos, diminuindo ao longo do tratamento.

Em trabalhos anteriores mostramos que pacientes com PCM produzem concentrações elevadas de CXCL9 e CXCL10 (15,54). Eosinófilos de pacientes asmáticos estimulados com IFN- γ e TNF- α também produzem CXCL9 e CXCL10 (126). Neste estudo, que teve como foco pacientes com a forma juvenil da doença, também verificamos concentrações séricas elevadas de CXCL9 e CXCL10, que diminuem durante o tratamento antifúngico.

Outro achado de nosso trabalho foi o fato do número eosinófilos que migram em resposta ao estímulo com a eotaxina e RANTES aumentar após o tratamento antifúngico, apesar dos níveis séricos dessas quimiocinas diminuírem. Uma possível explicação seria a possibilidade da resposta quimiotática dos eosinófilos à eotaxina ser inibida pelas quimiocinas CXCL9 e CXCL10, que também são capazes de se ligar ao receptor CCR3 (127,128).

Um dos pacientes analisados (CSS) apresentou um padrão diferente de resposta quimiotática com redução do número de eosinófilos que migraram em relação ao RANTES e a eotaxina, ao final do tratamento. Esta alteração foi acompanhada pelo aumento no número de eosinófilos no sangue periférico (de 0,65 para $1,31 \times 10^3/\text{mm}^3$) e dos níveis séricos de eotaxina e RANTES. Estes resultados poderiam indicar que o número aumentado de eosinófilos no sangue periférico estaria relacionado a uma menor capacidade de migração para os tecidos.

A adesão dos eosinófilos a células endoteliais é muito importante no processo de migração dos vasos sanguíneos para os tecidos e a eotaxina pode contribuir com esse processo aumentando a adesão e migração transendotelial dos eosinófilos. A IL-5 também atua como um mediador de ativação do eosinófilos, influenciando na adesão e quimiotaxia (121). Demonstramos que a eotaxina foi seletiva para a migração dos eosinófilos no período anterior ao

tratamento antifúngico. No entanto, a adesão dos eosinófilos às células endoteliais pulmonares humanas foi maior quando os eosinófilos foram estimulados previamente com eotaxina e IL-5 (100ng/mL). Liu e colaboradores mostraram uma maior porcentagem de adesão de eosinófilos de indivíduos atópicos à albumina de soro bovino (BSA) quando pré-incubados com eotaxina, comparada a IL-5 (10ng/mL) (129). Nossos resultados sugerem que na forma juvenil da PCM a eotaxina e a IL-5 podem contribuir para a ativação dos eosinófilos promovendo o aumento das propriedades adesivas e, em relação a eotaxina, da capacidade quimiotática, favorecendo assim o influxo dessas células para o sítio inflamatório.

Nosso estudo mostrou que os eosinófilos dos pacientes com a forma juvenil da PCM expressavam maior quantidade de moléculas CD11b, do que os controles, o que poderia resultar em maior capacidade de adesão. Também verificamos que os eosinófilos de pacientes encontravam-se muito ativados, (aumento significativo da expressão da molécula CD69), o que poderia ser resultante da expressão elevada de CD11b, já que esta molécula atua como receptor de β -glucano, polissacarídeo presente na parede de fungos, como o *P. brasiliensis* (35). A interação do receptor CD11b em eosinófilos com β -glucano na parede do fungo pode promover a liberação de proteínas citotóxicas, principalmente EDN (44).

No presente estudo demonstramos que as quimiocinas da família CC são importantes para a migração e adesão dos eosinófilos, principalmente a eotaxina (CCL11). De acordo com esses dados, a análise das biópsias de fígado e linfonodos dos pacientes com a forma juvenil da PCM mostrou intensa marcação para RANTES e eotaxina, sugerindo que a produção dessas quimiocinas poderia ter contribuído para a migração dos eosinófilos para o sítio inflamatório.

Além da produção de proteínas catiônicas partir dos grânulos citotóxicos, os eosinófilos também podem sintetizar e secretar espécies reativas de oxigênio e causar injúria no sítio de inflamação (65). Quando o eosinófilo é ativado ocorre o *burst* respiratório que resulta na produção de ânion superóxido e H_2O_2 . Esses produtos podem causar dano tecidual e o peróxido de hidrogênio pode interagir

com EPO dos eosinófilos e formar um produto extremamente tóxico (66,85). Quimiocinas, como o RANTES, também podem levar a produção dos radicais de oxigênio (130). Em nosso trabalho verificamos que a produção de peróxido de hidrogênio foi maior nos pacientes com PCM do que nos controles, embora as diferenças não tenham sido significantes. A produção de H_2O_2 por macrófagos e neutrófilos constitui um mecanismo de defesa muito importante contra o *P. brasiliensis* (103,131). No caso dos eosinófilos, a produção de H_2O_2 juntamente com a EPO poderia dar origem a um produto com propriedades fungicidas, contribuindo para o controle da doença.

Nossos resultados mostraram que eosinófilos de controles e de pacientes com PCM são capazes de matar diretamente leveduras de *P. brasiliensis*. Eosinófilos do grupo controle matam de maneira semelhante leveduras de baixa e alta virulência, e em relação a esta última, a IL-5 (25 ng/mL), estimula mais ainda a atividade fungicida. Por outro lado, em pacientes com PCM a resposta fungicida ocorreu apenas em relação à cepa de alta virulência (Pb18), não tendo sido observado nenhum efeito da IL-5. Uma explicação para este resultado poderia ser diferenças na composição da parede celular da levedura de alta virulência em relação à de baixa virulência (Pb265). Nos experimentos de expressão gênica também verificamos que em eosinófilos de pacientes com PCM as leveduras da cepa Pb18 induziram aumento da expressão de RNAm para IL-1 β , IL-2 e IL-4. Experimentos adicionais serão necessários para melhor esclarecer estes achados.

A resposta imune à infecção pelo *P. brasiliensis* é marcada por uma forte resposta inflamatória por parte do hospedeiro e diversos estudos têm demonstrado um aumento na síntese de mediadores inflamatórios como a IL-8 (55,132). Acorci e colaboradores (133) observaram inibição da apoptose de neutrófilos incubados com as leveduras *P. brasiliensis*, associado ao aumento da produção de IL-8 por essas células.

Eosinófilos de pacientes com PCM expressam o mRNA para a quimiocina IL-8/CXCL8 quando incubados durante 4 horas, confirmando os dados de Inoue e colaboradores (44) que estudaram eosinófilos humanos estimulados *in vitro* pelo

fungo *Alternaria alternata*. Neste estudo foi demonstrado que a IL-8 produzida por eosinófilos se dá através da *síntese de novo*, e por isso, como em nosso caso, não é observada na condição *ex-vivo*. Além de ser uma quimiocina para neutrófilos, a IL-8 também tem função quimiotática para eosinófilos de pacientes alérgicos (121). Na PCM esta citocina poderia atuar no início da infecção recrutando tanto neutrófilos como eosinófilos (134).

Os eosinófilos são leucócitos da resposta imune inata classicamente relacionados à resposta Th2 característica de infecções helmínticas e alérgicas (135,136). Eles se distinguem da maioria dos leucócitos pela capacidade de secreção mais rápida de citocinas devido a sua presença em grânulos intracelulares pré-formados (106), sendo capazes de secretar uma variedade de citocinas (137,138).

Avaliamos a expressão do mRNA de citocinas Th1 (IFN- γ , IL-2) e Th2 (IL-4, IL-10), citocinas inflamatórias (IL-6, IL-1 β , TNF- α) e quimiocinas (CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10) em eosinófilos de pacientes com PCM e controles. Para a maioria desses mediadores não encontramos diferenças significativas entre pacientes e controles. Entretanto, o RNAm de IL-2, IL-4 e IL-1 β foi diferencialmente expresso, sendo maior nos eosinófilos de pacientes com PCM do que em controles, principalmente em resposta à estimulação com leveduras da cepa Pb18. Também foi maior a expressão do RNAm para as quimiocinas CCL5 e CXCL8 em pacientes em todas as condições avaliadas.

A IL-1 β aumenta a hematopoiese, sendo um mediador inflamatório central que induz quimiocinas, moléculas de adesão e ativa eosinófilos (139-143). Estudos revelam que a iNOS pode ser induzida nos macrófagos pelo estimulação com IL-1 β e IFN- γ (144). Tendo em vista que eosinófilos de pacientes com PCM apresentam maior expressão do RNAm para IL-1 β , essas células poderiam ter um papel na ativação de macrófagos no sítio de inflamação e na febre e perda de peso, comumente associado a forma juvenil da doença.

A expressão aumentada do RNAm para IL-4 reforça a participação da resposta imune do tipo Th2 na forma juvenil da PCM, conforme descrito por vários

autores (14,15,145). Por outro lado, a produção de IL-2 por eosinófilos presentes em regiões próximas ao fungo poderia promover a proliferação e diferenciação dos linfócitos.

Pacientes com a forma juvenil da PCM apresentam eosinofilia periférica e níveis séricos mais elevados de proteínas dos grânulos citotóxicos comparados aos controles. A análise da expressão do RNAm para MBP e EPO não mostrou diferença entre pacientes e controles. Por outro lado, verificamos que a quantidade de RNAm de EDN e ECP decresce após o estimulação dos eosinófilos, sugerindo que sofreram um processo de degranulação. O mesmo padrão foi observado em eosinófilos de pacientes com eosinofilia promovida por infecções helmínticas, doenças alérgicas e síndrome hipereosinofílica (146).

Os eosinófilos estão presentes na corrente sanguínea em pequeno número e seu aumento na circulação sugere a existência de um mecanismo molecular que regula a seleção seletiva dessas células. Pacientes com PCM apresentam eosinofilia periférica e tecidual. Biópsias de fígado e linfonodos dos pacientes estudados mostraram forte marcação para eotaxina, RANTES e MBP. A MBP é uma proteína exclusiva de grânulos de eosinófilos, enquanto as quimiocinas eotaxina e RANTES tem ação seletiva sobre estas células. Além disso, também foi detectada marcação positiva para IL-25, citocina relacionada à resposta Th2, que induz a expressão gênica de IL-4 e IL-13 em diferentes tecidos, sendo que a administração sistêmica de IL-25 resulta em eosinofilia através da produção de IL-5 (147). A detecção de IDO pode ser também relacionada à imunossupressão descrita na PCM e a predominância da resposta Th2 (148,149).

As citocinas produzidas pelos eosinófilos são capazes de promover a proliferação, ativação e polarização das células T (33). Nesse estudo observamos que os eosinófilos possuem atributos para efetivamente apresentar antígenos aos linfócitos T CD4⁺ pois expressam moléculas de MHC de classe II e moléculas coestimulatórias como CD80 e CD86, conforme previamente descrito por Shi (36,104) e Beninati (150). Também observamos que os eosinófilos podem promover o reconhecimento antigênico através dos receptores do tipo Toll, como o

TLR-2 e TLR-4, cujo envolvimento na infecção pelo *P. brasiliensis* foi discutida em diferentes estudos (86,151). Dois receptores para a porção Fc da IgE, FcεRIα e FcεRII (CD23), relacionados principalmente a doenças alérgicas e helmínticas, mediando a imunidade via IgE, também foram avaliados, pois tratamentos com anti-CD23 diminuí as reações inflamatórias e a eosinofilia (152). Analisando a frequência de eosinófilos positivos para esses receptores observamos menor porcentagem de células CD80+, MHC de classe II+, TLR-4+ e CD23+ em pacientes com PCM do que em saudáveis.

Um dos componentes necessários para o tráfego dos eosinófilos são as moléculas de adesão. Citocinas pró-inflamatórias como TNF-α estimulam a expressão de moléculas de adesão celular tais como ICAM-1, VCAM-1 que estão envolvidas no recrutamento de leucócitos para os sítios inflamatórios (102). Os eosinófilos expressam numerosas moléculas de adesão como as integrinas α4β7, as moléculas da família CD18 que são β2 integrinas (LFA-1 e Mac-1) e o VLA-4 que é uma β1 integrina. Eosinófilos não expressam dectina-1, receptor de β-glucana, presente em macrófagos e neutrófilos. Entretanto, expressam constitutivamente moléculas CD11b, uma β2 integrina que pode reconhecer o β glucano, componente da parede celular do *P. brasiliensis*, promovendo a interação com o fungo, ativação do eosinófilo e consequente liberação dos seus grânulos citotóxicos (62).

Este é o primeiro trabalho que avaliou a frequência de marcadores relacionados ao reconhecimento e apresentação antigênica, moléculas de adesão, de ativação, receptores de IgE e de migração quimiotática (CCR3) em eosinófilos dos pacientes com a forma juvenil da PCM durante o tratamento antifúngico. De acordo com os nossos dados, houve redução entre o 3º e 14º mês de tratamento dos marcadores relacionados a apresentação de antígeno como a molécula de MHC de classe II e as moléculas coestimulatórias CD80 e CD86. Também observamos redução da frequência do receptor CCR3, do marcador de ativação CD69, do CD23 e da molécula CD11a (LFA-1). Os receptores do tipo Toll, TLR-2 e

TLR-4, também diminuíram durante o tratamento, mas não observamos diferença estatística.

Embora a frequência de eosinófilos positivos para moléculas associadas ao reconhecimento e apresentação de antígenos tenha sido menor em pacientes comparado a controles, o fato de ocorrer uma redução ainda maior durante o tratamento sugere uma possível participação dessas células na apresentação de antígenos e na polarização da resposta imune na PCM.

Em conjunto, nossos dados mostraram no início da infecção eosinofilia periférica em 86,7% dos pacientes com a forma juvenil da PCM, assim como altos títulos de anticorpos anti-*P. brasiliensis*, elevada concentração sérica de proteína C reativa, de proteínas dos grânulos (MBP, EPO, ECP e EDN) e de quimiocinas (RANTES e CXCL9). Além disso, verificamos que os eosinófilos estavam muito ativados (alta expressão de CD69), com capacidade de migrar em resposta à eotaxina (quimiocina seletiva para eosinófilos e basófilos), aderir a células endoteliais e expressar RNAm para IL-1 β , IL-2, IL-4, CCL5 e CXCL8. Nas lesões causadas pelo fungo em linfonodos e fígado foi detectada marcação positiva para MBP, eotaxina, RANTES, IL-25 e IDO. Desta forma, os eosinófilos poderiam estar contribuindo para a intensa resposta inflamatória que caracteriza a fase inicial da forma juvenil da PCM e prejudica a resposta de eliminação do fungo. Após o tratamento antifúngico, observou-se uma diminuição dos parâmetros analisados, exceto a capacidade quimiotática dos eosinófilos que aumentou devido, provavelmente, a redução de inibidores da quimiotaxia como o CXCL9 e CXCL10.

CONCLUSÕES

Em conclusão, o presente trabalho permitiu demonstrar que no início da infecção os eosinófilos se encontram em número elevado no sangue periférico dos pacientes, assim como o título de anticorpos anti-*P. brasiliensis* e a concentração sérica de proteína C reativa, proteínas dos grânulos (MBP, EPO, ECP e EDN) e quimiocinas (RANTES e CXCL9). Além disso, verificamos que os eosinófilos estavam muito ativados (alta expressão de CD69), com capacidade de migrar em resposta à eotaxina (quimiocina seletiva para eosinófilos e basófilos) e aderir a células endoteliais. Desta forma, os eosinófilos poderiam estar contribuindo para a intensa resposta inflamatória que caracteriza a fase inicial da forma juvenil da PCM e prejudica a resposta de eliminação do fungo. Após o tratamento antifúngico, observou-se uma diminuição dos parâmetros analisados, exceto a capacidade quimiotática dos eosinófilos que aumentou devido, provavelmente, a redução de inibidores da quimiotaxia como o CXCL9 e CXCL10.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marques SA. Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2003; 78 (2): 135-46.
2. Ramos ESM, Saraiva Ldo E. Paracoccidioidomycosis. *Dermatol Clin*. 2008; 26 (2): 257-69, vii.
3. Theodoro RC, Candeias JM, Araujo JP, Jr., Bosco Sde M, Macoris SA, Padula LO et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol*. 2005; 43 (8): 725-9.
4. Aristizabal BH, Clemons KV, Cock AM, Restrepo A, Stevens DA. Experimental paracoccidioides brasiliensis infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Med Mycol*. 2002; 40 (2): 169-78.
5. Aristizabal BH, Clemons KV, Stevens DA, Restrepo A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. *Infect Immun*. 1998; 66 (11): 5587-91.
6. Felipe MS, Torres FA, Maranhao AQ, Silva-Pereira I, Pocas-Fonseca MJ, Campos EG et al. Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005; 45 (3): 369-81.
7. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho Fde Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006; 39 (3): 297-310.
8. Almeida OP, Jacks J, Jr., Scully C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003; 14 (5): 377-83.
9. Fortes MR, Miot HA, Kurokawa CS, Marques ME, Marques SA. Immunology of paracoccidioidomycosis. *An Bras Dermatol*. 86 (3): 516-24.
10. Marques SA. Paracoccidioidomicose. . *An Bras Dermatol* 1998; 5 (73): 455–69.
11. Wanke B, Aide MA. Chapter 6--paracoccidioidomycosis. *J Bras Pneumol*. 2009; 35 (12): 1245-9.
12. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev*. 1993; 6 (2): 89-117.
13. Rivitti EA, Aoki V. Deep fungal infections in tropical countries. *Clin Dermatol*. 1999; 17 (2): 171-90; discussion 05-6.
14. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect*. 2002; 4 (2): 139-44.
15. Mamoni RL, Blotta MH. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 2006; 35 (3-4): 207-16.
16. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 2001; 13 (4): 248-52.
17. Mamoni RL, Nouer SA, Oliveira SJ, Musatti CC, Rossi CL, Camargo ZP et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2002; 40 (2): 153-9.

18. Pereira RM, Bucarechi F, Barison Ede M, Hessel G, Tresoldi AT. Paracoccidioidomycosis in children: clinical presentation, follow-up and outcome. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2004; 46 (3): 127-31.
19. Nogueira MG, Andrade GM, Tonelli E, Diniz SN, Goes AM, Cisalpino PS. [Laboratory evolutive aspects of children under paracoccidioidomycosis treatment]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006; 39 (5): 478-83.
20. Calich VL, Kashino SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res*. 1998; 31 (5): 615-23.
21. Calich VL, Vaz CA, Burger E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res Immunol*. 1998; 149 (4-5): 407-17; discussion 99-500.
22. Vaz CA, Singer-Vermes LM, Calich VL. Comparative studies on the antibody repertoire produced by susceptible and resistant mice to virulent and nonvirulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 59 (6): 971-7.
23. Kita H. Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunol Rev*. 2011; 242 (1): 161-77.
24. Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med*. 1998; 338 (22): 1592-600.
25. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*. 2006; 24: 147-74.
26. Benard G, Hong MA, Del Negro GM, Batista L, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJ. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg*. 1996; 54 (1): 7-12.
27. Shikanai-Yasuda MA, Higaki Y, Uip DE, Mori NS, Del Negro G, Melo NT et al. [Bone marrow involvement and eosinophilia in paracoccidioidomycosis]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1992; 34 (2): 85-90.
28. de Campos EP, Bertoli CJ, Barbosa KS. [Pulmonary lymph node in acute juvenile paracoccidioidomycosis (a case report)]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1992; 25 (3): 195-200.
29. Tresoldi AT, Pereira RM, Castro LC, Rigatto SZ, Belangero VM. [Hypercalcemia and multiple osteolytic lesions in a child with disseminated paracoccidioidomycosis and pulmonary tuberculosis]. *J Pediatr (Rio J)*. 2005; 81 (4): 349-52.
30. Pereira RM, Tresoldi AT, da Silva MT, Bucarechi F. Fatal disseminated paracoccidioidomycosis in a two-year-old child. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2004; 46 (1): 37-9.
31. Martinez R, Moya MJ. Primary complex of paracoccidioidomycosis and hypereosinophilia. *J Bras Pneumol*. 2009; 35 (12): 1259-62.
32. Kashino SS, Fazioli RA, Cafalli-Favati C, Meloni-Bruneri LH, Vaz CA, Burger E et al. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. *J Interferon Cytokine Res*. 2000; 20 (1): 89-97.
33. Kita H. The eosinophil: a cytokine-producing cell? *J Allergy Clin Immunol*. 1996; 97 (4): 889-92.
34. Lacy P, Moqbel R. Eokines: synthesis, storage and release from human eosinophils. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997; 92 Suppl 2: 125-33.

35. Shamri R, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res.* 2011; 343 (1): 57-83.
36. Shi HZ. Eosinophils function as antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol.* 2004; 76 (3): 520-7.
37. Walsh GM. Eosinophil granule proteins and their role in disease. *Curr Opin Hematol.* 2001; 8 (1): 28-33.
38. Abu-Ghazaleh RI, Gleich GJ, Prendergast FG. Interaction of eosinophil granule major basic protein with synthetic lipid bilayers: a mechanism for toxicity. *J Membr Biol.* 1992; 128 (2): 153-64.
39. Specht S, Saeftel M, Arndt M, Endl E, Dubben B, Lee NA et al. Lack of eosinophil peroxidase or major basic protein impairs defense against murine filarial infection. *Infect Immun.* 2006; 74 (9): 5236-43.
40. Rohrbach MS, Wheatley CL, Slifman NR, Gleich GJ. Activation of platelets by eosinophil granule proteins. *J Exp Med.* 1990; 172 (4): 1271-4.
41. Wagner JM, Franco M, Kephart GM, Gleich GJ. Localization of eosinophil granule major basic protein in paracoccidioidomycosis lesions. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 59 (1): 66-72.
42. Domachowske JB, Dyer KD, Bonville CA, Rosenberg HF. Recombinant human eosinophil-derived neurotoxin/RNase 2 functions as an effective antiviral agent against respiratory syncytial virus. *J Infect Dis.* 1998; 177 (6): 1458-64.
43. Yang D, Chen Q, Su SB, Zhang P, Kurosaka K, Caspi RR et al. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. *J Exp Med.* 2008; 205 (1): 79-90.
44. Inoue Y, Matsuwaki Y, Shin SH, Ponikau JU, Kita H. Nonpathogenic, environmental fungi induce activation and degranulation of human eosinophils. *J Immunol.* 2005; 175 (8): 5439-47.
45. Glimelius I, Rubin J, Fischer M, Molin D, Amini RM, Venge P et al. Effect of eosinophil cationic protein (ECP) on Hodgkin lymphoma cell lines. *Exp Hematol.* 2011; 39 (8): 850-8.
46. Leutscher PD, van Dam GT, Reimert CM, Ramarakoto CE, Deelder AM, Ornbjerg N. Eosinophil cationic protein, soluble egg antigen, circulating anodic antigen, and egg excretion in male urogenital schistosomiasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 79 (3): 422-6.
47. Midzi N, Ndhlovu PD, Nyanga L, Kjetland EF, Reimert CM, Vennervald BJ et al. Assessment of eosinophil cationic protein as a possible diagnostic marker for female genital schistosomiasis in women living in a *Schistosoma haematobium* endemic area. *Parasite Immunol.* 2003; 25 (11-12): 581-8.
48. Rosenberg HF, Domachowske JB. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J Leukoc Biol.* 2001; 70 (5): 691-8.
49. Domachowske JB, Dyer KD, Adams AG, Leto TL, Rosenberg HF. Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26 (14): 3358-63.

50. Mitra SN, Slungaard A, Hazen SL. Role of eosinophil peroxidase in the origins of protein oxidation in asthma. *Redox Rep.* 2000; 5 (4): 215-24.
51. Wong DT, Elovic A, Matossian K, Nagura N, McBride J, Chou MY et al. Eosinophils from patients with blood eosinophilia express transforming growth factor beta 1. *Blood.* 1991; 78 (10): 2702-7.
52. Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood.* 1992; 79 (12): 3101-9.
53. Wang YH, Angkasekwinai P, Lu N, Voo KS, Arima K, Hanabuchi S et al. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med.* 2007; 204 (8): 1837-47.
54. Corvino CL, Mamoni RL, Fagundes GZ, Blotta MH. Serum interleukin-18 and soluble tumour necrosis factor receptor 2 are associated with disease severity in patients with paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Immunol.* 2007; 147 (3): 483-90.
55. Neworal EP, Altemani A, Mamoni RL, Noronha IL, Blotta MH. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 2003; 21 (5): 234-41.
56. Rankin SM, Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. *Mol Med Today.* 2000; 6 (1): 20-7.
57. Gonzalez A, Lenzi HL, Motta EM, Caputo L, Sahaza JH, Cock AM et al. Expression of adhesion molecules in lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Microbes Infect.* 2005; 7 (4): 666-73.
58. Wardlaw AJ. Molecular basis for selective eosinophil trafficking in asthma: A multistep paradigm. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 104 (5): 917-26.
59. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy.* 2008; 38 (5): 709-50.
60. Abraham WM, Sielczak MW, Ahmed A, Cortes A, Lauredo IT, Kim J et al. Alpha 4-integrins mediate antigen-induced late bronchial responses and prolonged airway hyperresponsiveness in sheep. *J Clin Invest.* 1994; 93 (2): 776-87.
61. Gonzalo JA, Lloyd CM, Kremer L, Finger E, Martinez AC, Siegelman MH et al. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. *J Clin Invest.* 1996; 98 (10): 2332-45.
62. Yoon J, Ponikau JU, Lawrence CB, Kita H. Innate antifungal immunity of human eosinophils mediated by a beta 2 integrin, CD11b. *J Immunol.* 2008; 181 (4): 2907-15.
63. Nagata M, Sedgwick JB, Kita H, Busse WW. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor augments ICAM-1 and VCAM-1 activation of eosinophil function. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998; 19 (1): 158-66.
64. Kato M, Abraham RT, Okada S, Kita H. Ligation of the beta2 integrin triggers activation and degranulation of human eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998; 18 (5): 675-86.
65. Ezeamuzie CI, Taslim N. Reactive oxygen species mediate phorbol ester-stimulated cAMP response in human eosinophils. *Eur J Pharmacol.* 2006; 543 (1-3): 174-80.

66. Giembycz MA, Lindsay MA. Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol Rev.* 1999; 51 (2): 213-340.
67. Takaku Y, Nakagome K, Kobayashi T, Hagiwara K, Kanazawa M, Nagata M. IFN-gamma-inducible protein of 10 kDa upregulates the effector functions of eosinophils through beta2 integrin and CXCR3. *Respir Res.* 2011; 12: 138.
68. Nagata M, Sedgwick JB, Vrtis R, Busse WW. Endothelial cells upregulate eosinophil superoxide generation via VCAM-1 expression. *Clin Exp Allergy.* 1999; 29 (4): 550-61.
69. Laudanna C, Melotti P, Bonizzato C, Piacentini G, Boner A, Serra MC et al. Ligation of members of the beta 1 or the beta 2 subfamilies of integrins by antibodies triggers eosinophil respiratory burst and spreading. *Immunology.* 1993; 80 (2): 273-80.
70. MacPherson JC, Comhair SA, Erzurum SC, Klein DF, Lipscomb MF, Kavuru MS et al. Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. *J Immunol.* 2001; 166 (9): 5763-72.
71. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43 (2): 109-42.
72. Lopez-Farre A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Millas I, Monton M et al. Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions. Role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation.* 1995; 91 (7): 2080-8.
73. del Pozo V, de Arruda-Chaves E, de Andres B, Cardaba B, Lopez-Farre A, Gallardo S et al. Eosinophils transcribe and translate messenger RNA for inducible nitric oxide synthase. *J Immunol.* 1997; 158 (2): 859-64.
74. Beauvais F, Michel L, Dubertret L. The nitric oxide donors, azide and hydroxylamine, inhibit the programmed cell death of cytokine-deprived human eosinophils. *FEBS Lett.* 1995; 361 (2-3): 229-32.
75. Ferreira HH, Medeiros MV, Lima CS, Flores CA, Sannomiya P, Autunes E et al. Inhibition of eosinophil chemotaxis by chronic blockade of nitric oxide biosynthesis. *Eur J Pharmacol.* 1996; 310 (2-3): 201-7.
76. Thomazzi SM, Ferreira HH, Conran N, De Nucci G, Antunes E. Role of nitric oxide on in vitro human eosinophil migration. *Biochem Pharmacol.* 2001; 62 (10): 1417-21.
77. Bocca AL, Hayashi EE, Pinheiro AG, Furlanetto AB, Campanelli AP, Cunha FQ et al. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *J Immunol.* 1998; 161 (6): 3056-63.
78. Gonzalez A, de Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect Immun.* 2000; 68 (5): 2546-52.
79. Moreira AP, Dias-Melicio LA, Soares AM. Interleukin-10 but not Transforming Growth Factor beta inhibits murine activated macrophages *Paracoccidioides brasiliensis* killing: effect on H₂O₂ and NO production. *Cell Immunol.* 2010; 263 (2): 196-203.

80. Odemuyiwa SO, Ghahary A, Li Y, Puttagunta L, Lee JE, Musat-Marcu S et al. Cutting edge: human eosinophils regulate T cell subset selection through indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Immunol.* 2004; 173 (10): 5909-13.
81. Tulic MK, Sly PD, Andrews D, Crook M, Davoine F, Odemuyiwa SO et al. Thymic indoleamine 2,3-dioxygenase-positive eosinophils in young children: potential role in maturation of the naive immune system. *Am J Pathol.* 2009; 175 (5): 2043-52.
82. Araujo EF, *A IDO controla a carga fúngica e a imunidade celular de camundongos suscetíveis e resistentes a infecção pelo Paracoccidioides brasiliensis*, in [Dissertação] São Paulo (SP): Universidade de São Paulo. 2009, Universidade de São Paulo.
83. Ponath PD, Qin S, Ringler DJ, Clark-Lewis I, Wang J, Kassam N et al. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J Clin Invest.* 1996; 97 (3): 604-12.
84. Tachimoto H, Ebisawa M, Bochner BS. Cross-talk between integrins and chemokines that influences eosinophil adhesion and migration. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002; 128 Suppl 1: 18-20.
85. Blanchard C, Rothenberg ME. Biology of the eosinophil. *Adv Immunol.* 2009; 101: 81-121.
86. Bonfim CV, Mamoni RL, Blotta MH. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2009; 47 (7): 722-33.
87. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K et al. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol.* 2003; 171 (8): 3977-82.
88. Plotz SG, Lentschat A, Behrendt H, Plotz W, Hamann L, Ring J et al. The interaction of human peripheral blood eosinophils with bacterial lipopolysaccharide is CD14 dependent. *Blood.* 2001; 97 (1): 235-41.
89. Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MK, Dower SK. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol.* 2002; 168 (9): 4701-10.
90. Hensley SE, Amalfitano A. Toll-like receptors impact on safety and efficacy of gene transfer vectors. *Mol Ther.* 2007; 15 (8): 1417-22.
91. van der Graaf CA, Netea MG, Verschueren I, van der Meer JW, Kullberg BJ. Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect Immun.* 2005; 73 (11): 7458-64.
92. Lintomen L, Franchi G, Nowill A, Condino-Neto A, de Nucci G, Zanesco A et al. Human eosinophil adhesion and degranulation stimulated with eotaxin and RANTES in vitro: lack of interaction with nitric oxide. *BMC Pulm Med.* 2008; 8: 13.
93. Raap U, Deneka N, Bruder M, Kapp A, Wedi B. Differential up-regulation of neurotrophin receptors and functional activity of neurotrophins on peripheral blood eosinophils of patients with allergic rhinitis, atopic dermatitis and nonatopic subjects. *Clin Exp Allergy.* 2008; 38 (9): 1493-8.

94. Costa GG, Silva RM, Franco-Penteado CF, Antunes E, Ferreira HH. Interactions between eotaxin and interleukin-5 in the chemotaxis of primed and non-primed human eosinophils. *Eur J Pharmacol.* 2007; 566 (1-3): 200-5.
95. Muanza K, Gay F, Behr C, Scherf A. Primary culture of human lung microvessel endothelial cells: a useful in vitro model for studying *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte cytoadherence. *Res Immunol.* 1996; 147 (3): 149-63.
96. Burke-Gaffney A, Hellewell PG. Eotaxin stimulates eosinophil adhesion to human lung microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 227 (1): 35-40.
97. Elbim C, Lizard G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. *Cytometry A.* 2009; 75 (6): 475-81.
98. Lacy P, Abdel-Latif D, Steward M, Musat-Marcu S, Man SF, Moqbel R. Divergence of mechanisms regulating respiratory burst in blood and sputum eosinophils and neutrophils from atopic subjects. *J Immunol.* 2003; 170 (5): 2670-9.
99. Na HJ, Hudson SA, Bochner BS. IL-33 enhances Siglec-8 mediated apoptosis of human eosinophils. *Cytokine.* 2011.
100. Ferreira MC, de Oliveira RT, da Silva RM, Blotta MH, Mamoni RL. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* 2010; 78 (10): 4392-401.
101. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29 (9): e45.
102. Burke-Gaffney A, Hellewell PG. Tumour necrosis factor-alpha-induced ICAM-1 expression in human vascular endothelial and lung epithelial cells: modulation by tyrosine kinase inhibitors. *Br J Pharmacol.* 1996; 119 (6): 1149-58.
103. Carmo JP, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peracoli MT, Soares AM. TNF-alpha activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H2O2-dependent mechanism. *Med Mycol.* 2006; 44 (4): 363-8.
104. Shi HZ, Humbles A, Gerard C, Jin Z, Weller PF. Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *J Clin Invest.* 2000; 105 (7): 945-53.
105. Garro AP, Chiapello LS, Baronetti JL, Masih DT. Eosinophils elicit proliferation of naive and fungal-specific cells in vivo so enhancing a T helper type 1 cytokine profile in favour of a protective immune response against *Cryptococcus neoformans* infection. *Immunology.* 2011; 134 (2): 198-213.
106. Lacy P, Moqbel R. Eosinophil cytokines. *Chem Immunol.* 2000; 76: 134-55.
107. Melo RC, Weller PF. Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. *Histol Histopathol.* 2010; 25 (10): 1341-54.
108. Neves AR, Mamoni RL, Rossi CL, de Camargo ZP, Blotta MH. Negative immunodiffusion test results obtained with sera of paracoccidioidomycosis patients may be related to low-avidity immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003; 10 (5): 802-7.

109. Velazquez JR, Lacy P, Mahmudi-Azer S, Bablitz B, Milne CD, Denburg JA et al. Interleukin-4 and RANTES expression in maturing eosinophils derived from human cord blood CD34+ progenitors. *Immunology*. 2000; 101 (3): 419-25.
110. Velazquez JR, Lacy P, Moqbel R. Replenishment of RANTES mRNA expression in activated eosinophils from atopic asthmatics. *Immunology*. 2000; 99 (4): 591-9.
111. Liu LY, Bates ME, Jarjour NN, Busse WW, Bertics PJ, Kelly EA. Generation of Th1 and Th2 chemokines by human eosinophils: evidence for a critical role of TNF-alpha. *J Immunol*. 2007; 179 (7): 4840-8.
112. Romagnani P, Annunziato F, Lazzeri E, Cosmi L, Beltrame C, Lasagni L et al. Interferon-inducible protein 10, monokine induced by interferon gamma, and interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant are produced by thymic epithelial cells and attract T-cell receptor (TCR) alphabeta+ CD8+ single-positive T cells, TCRgammadelta+ T cells, and natural killer-type cells in human thymus. *Blood*. 2001; 97 (3): 601-7.
113. Sallusto F. The role of chemokines and chemokine receptors in T cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Haematologica*. 1999; 84 Suppl EHA-4: 28-31.
114. Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today*. 1998; 19 (12): 568-74.
115. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*. 1998; 338 (7): 436-45.
116. Zietkowski Z, Skiepkowski R, Tomasiak-Lozowska MM, Mroczko B, Szmitkowski M, Bodzenta-Lukaszyk A. RANTES in exhaled breath condensate of allergic asthma patients with exercise-induced bronchoconstriction. *Respiration*. 2010; 80 (6): 463-71.
117. Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, Silva JS. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol*. 2000; 156 (5): 1811-20.
118. Bromley SK, Mempel TR, Luster AD. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol*. 2008; 9 (9): 970-80.
119. Plager DA, Henke SA, Matsuwaki Y, Madaan A, Squillace DL, Dierkhising RA et al. Pimecrolimus reduces eosinophil activation associated with calcium mobilization. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009; 149 (2): 119-26.
120. Ito W, Takeda M, Fujita M, Kamada Y, Kato H, Chiba T et al. Hepatocyte growth factor suppresses production of reactive oxygen species and release of eosinophil-derived neurotoxin from human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008; 147 (4): 331-7.
121. Lampinen M, Carlson M, Hakansson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy*. 2004; 59 (8): 793-805.
122. Ahrens R, Waddell A, Seidu L, Blanchard C, Carey R, Forbes E et al. Intestinal macrophage/epithelial cell-derived CCL11/eotaxin-1 mediates eosinophil recruitment and function in pediatric ulcerative colitis. *J Immunol*. 2008; 181 (10): 7390-9.

123. Gurish MF, Humbles A, Tao H, Finkelstein S, Boyce JA, Gerard C et al. CCR3 is required for tissue eosinophilia and larval cytotoxicity after infection with *Trichinella spiralis*. *J Immunol*. 2002; 168 (11): 5730-6.
124. Badewa AP, Hudson CE, Heiman AS. Regulatory effects of eotaxin, eotaxin-2, and eotaxin-3 on eosinophil degranulation and superoxide anion generation. *Exp Biol Med* (Maywood). 2002; 227 (8): 645-51.
125. Kampen GT, Stafford S, Adachi T, Jinquan T, Quan S, Grant JA et al. Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Blood*. 2000; 95 (6): 1911-7.
126. Dajotoy T, Andersson P, Bjartell A, Lofdahl CG, Tapper H, Egesten A. Human eosinophils produce the T cell-attracting chemokines MIG and IP-10 upon stimulation with IFN-gamma. *J Leukoc Biol*. 2004; 76 (3): 685-91.
127. Fulkerson PC, Zhu H, Williams DA, Zimmermann N, Rothenberg ME. CXCL9 inhibits eosinophil responses by a CCR3- and Rac2-dependent mechanism. *Blood*. 2005; 106 (2): 436-43.
128. Xanthou G, Duchesnes CE, Williams TJ, Pease JE. CCR3 functional responses are regulated by both CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11. *Eur J Immunol*. 2003; 33 (8): 2241-50.
129. Liu J, Munoz NM, Meliton AY, Zhu X, Lambertino AT, Xu C et al. Beta2-integrin adhesion caused by eotaxin but not IL-5 is blocked by PDE-4 inhibition and beta2-adrenoceptor activation in human eosinophils. *Pulm Pharmacol Ther*. 2004; 17 (2): 73-9.
130. Chihara J, Yamada H, Yamamoto T, Kurachi D, Hayashi-Kameda N, Honda K et al. Priming effect of RANTES on eosinophil oxidative metabolism. *Allergy*. 1998; 53 (12): 1178-82.
131. Rodrigues DR, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peracoli MT, Soares AM. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol*. 2007; 45 (1): 27-33.
132. Figueiredo F, Alves LM, Silva CL. Tumour necrosis factor production in vivo and in vitro in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. *Clin Exp Immunol*. 1993; 93 (2): 189-94.
133. Acorci MJ, Dias-Melicio LA, Golim MA, Bordon-Graciani AP, Peracoli MT, Soares AM. Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: role of interleukin-8. *Scand J Immunol*. 2009; 69 (2): 73-9.
134. Calich VL, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br J Exp Pathol*. 1985; 66 (5): 585-94.
135. Shinkai K, Mohrs M, Locksley RM. Helper T cells regulate type-2 innate immunity in vivo. *Nature*. 2002; 420 (6917): 825-9.
136. Spencer LA, Weller PF. Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. *Immunol Cell Biol*. 2009; 88 (3): 250-6.

137. Grewe M, Czech W, Morita A, Werfel T, Klammer M, Kapp A et al. Human eosinophils produce biologically active IL-12: implications for control of T cell responses. *J Immunol.* 1998; 161 (1): 415-20.
138. Woerly G, Roger N, Loiseau S, Capron M. Expression of Th1 and Th2 immunoregulatory cytokines by human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999; 118 (2-4): 95-7.
139. Birdsall HH, Lane C, Ramser MN, Anderson DC. Induction of VCAM-1 and ICAM-1 on human neural cells and mechanisms of mononuclear leukocyte adherence. *J Immunol.* 1992; 148 (9): 2717-23.
140. Hestdal K, Ruscetti FW, Chizzonite R, Ortiz M, Gooya JM, Longo DL et al. Interleukin-1 (IL-1) directly and indirectly promotes hematopoietic cell growth through type I IL-1 receptor. *Blood.* 1994; 84 (1): 125-32.
141. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996; 87 (6): 2095-147.
142. Gounni AS, Nutku E, Koussih L, Aris F, Louahed J, Levitt RC et al. IL-9 expression by human eosinophils: regulation by IL-1beta and TNF-alpha. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106 (3): 460-6.
143. Jedrzkiewicz S, Nakamura H, Silverman ES, Luster AD, Mansharamani N, In KH et al. IL-1beta induces eotaxin gene transcription in A549 airway epithelial cells through NF-kappaB. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279 (6): L1058-65.
144. Ohsugi S, Iwasaki Y, Takemura Y, Nagata K, Harada H, Yokomura I et al. An inhaled inducible nitric oxide synthase inhibitor reduces damage of Candida-induced acute lung injury. *Biomed Res.* 2007; 28 (2): 91-9.
145. Mamoni RL, Blotta MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine.* 2005; 32 (1): 20-9.
146. Gruart V, Truong MJ, Plumas J, Zandecki M, Kusnierz JP, Prin L et al. Decreased expression of eosinophil peroxidase and major basic protein messenger RNAs during eosinophil maturation. *Blood.* 1992; 79 (10): 2592-7.
147. Tamachi T, Maezawa Y, Ikeda K, Iwamoto I, Nakajima H. Interleukin 25 in allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006; 140 Suppl 1: 59-62.
148. Corrigan CJ, Wang W, Meng Q, Fang C, Eid G, Caballero MR et al. Allergen-induced expression of IL-25 and IL-25 receptor in atopic asthmatic airways and late-phase cutaneous responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2011; 128 (1): 116-24.
149. Corrigan CJ, Wang W, Meng Q, Fang C, Wu H, Reay V et al. T-helper cell type 2 (Th2) memory T cell-potentiating cytokine IL-25 has the potential to promote angiogenesis in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 (4): 1579-84.
150. Beninati W, Derdak S, Dixon PF, Grider DJ, Strollo DC, Hensley RE et al. Pulmonary eosinophils express HLA-DR in chronic eosinophilic pneumonia. *J Allergy Clin Immunol.* 1993; 92 (3): 442-9.
151. Kvarnhammar AM, Cardell LO. Pattern-recognition receptors in human eosinophils. *Immunology.* 2012; 136 (1): 11-20.
152. Rosenwasser LJ, Meng J. Anti-CD23. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2005; 29 (1): 61-72.

APÊNDICE

1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 18/07/08.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 449/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0361.0.146.000-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “RESPOSTA DE EOSINÓFILOS HUMANOS À INFECÇÃO CAUSADA PELO PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Fernanda Gamboli Braga-Amarante

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas / UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/06/2008

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 18/07/09 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Investigar a resposta de eosinófilos de doadores sadios ao fungo *Paracoccidioides brasiliensis* das cepas Pb18, de alta virulência e Pb265, de baixa virulência e compará-la a resposta de pacientes com a forma juvenil da PCM frente aos mesmos estímulos. Também será avaliada a presença de eosinófilos e seus produtos nas lesões causadas por este fungo em pacientes com a forma juvenil e adulta da PCM.

III - SUMÁRIO

O referido projeto tem por finalidade a obtenção de dados por meio de pesquisa tipo exploratória / descritiva. Serão estudados os eosinófilos do sangue periférico de 8 indivíduos sadios e de 8 pacientes, menores de 18 anos e adultos, de ambos os sexos, selecionados nos ambulatórios de Pediatria e de Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas da UNICAMP. O diagnóstico da paracoccidioidomicose (PCM) será estabelecido pelo achado do fungo em exame direto e/ou sorologia (imunodifusão). Serão analisados eosinófilos de doadores sadios e de pacientes com a forma juvenil da paracoccidioidomicose. Além disso, serão analisadas biópsias de pacientes com as formas juvenil e adulta da doença como o objetivo de verificar a presença de eosinófilos e seus produtos. Para participar da pesquisa os pacientes serão avaliados por equipe médica, a qual verificará a dequação dos mesmos ao estudo. Cada indivíduo será informado sobre o estudo e se concordar em participar, assinará o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Serão excluídos desse estudo indivíduos com asma, reações alérgicas, parasitoses helmínticas, uso nas quatro semanas anteriores à coleta ou freqüente de corticóides, 6-mercaptopurina, azatioprina, metotrexato, ciclosporina, talidomida, infliximab e drogas anti-inflamatórias não esteróides. Aqueles que aceitarem participar serão submetidos a uma punção de sangue periférico (60ml por doadores adultos e para os pacientes pediátricos o volume de sangue será inferior a 5% da volemia). Os dados provenientes dos sujeitos e os resultados obtidos a partir do material biológico coletado poderão ser publicados para ensino.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

fone (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após análise das respostas as pendências, o projeto encontra-se adequado a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).


O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

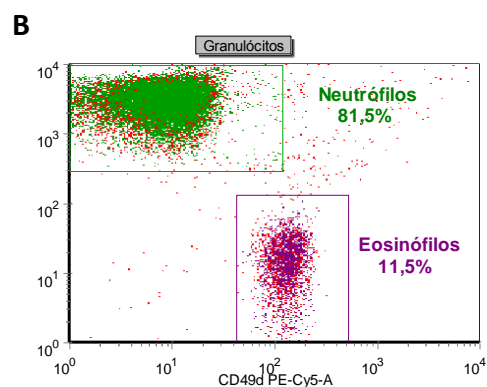
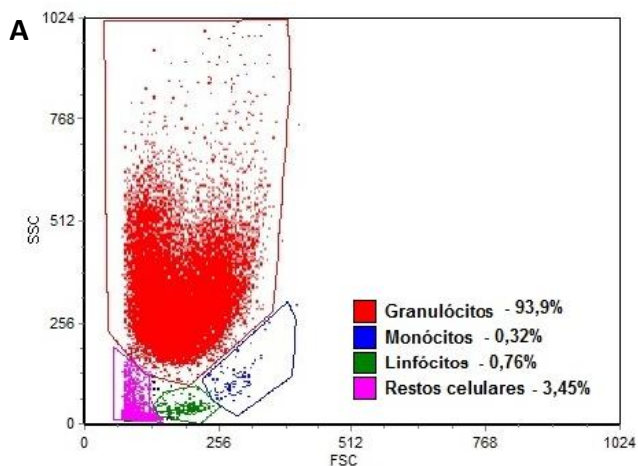
VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de junho de 2008.

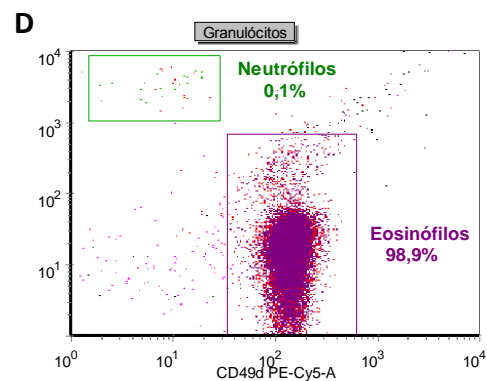
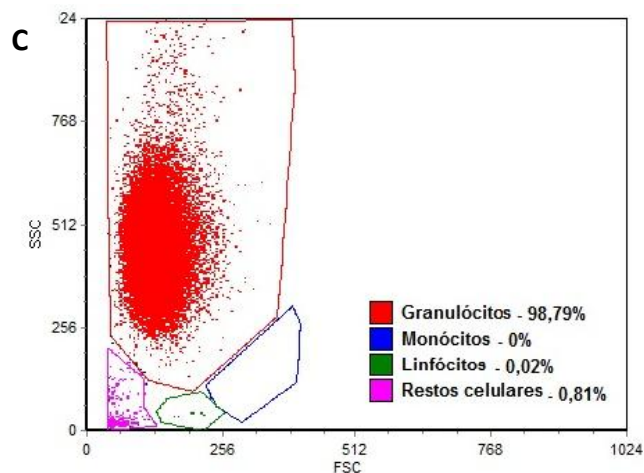

Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

2. Avaliação do método de isolamento de eosinófilos pelo gradiente de densidade de Percoll® e separação imunomagnética

- Separação com o gradiente de Percoll®



- Separação pelo método de seleção negativa utilizando beads magnéticas



- Células retidas na malha magnética da coluna

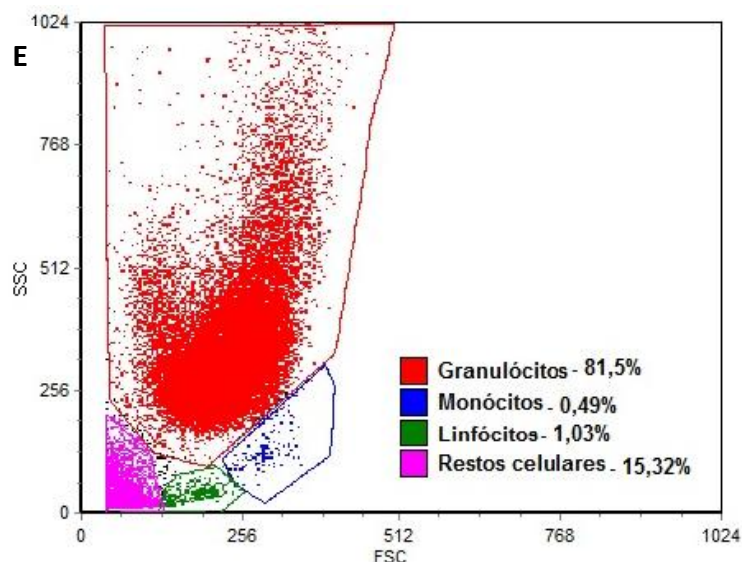


Figura 32 (página acima e anterior): “Dot-plots” representativos da separação de eosinófilos pelo gradiente de densidade de Percoll e separação com beads. A, C e E – “Dot-plots” da dispersão celular por tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC) nos quais estão representadas as populações de granulócitos (vermelho), linfócitos (verde) e monócitos (azul). B e C - Dot-plots” representativos com a análise de marcação com anti-CD16 (neutrófilos) e anti-CD49d (eosinófilos) na população de granulócitos.

3. Anticorpos e controle negativo da reação de imuno-histoquímica

Tabela V: Anticorpos utilizados na reação de Imuno-histoquímica.

Anticorpo	Fabricante
anti-eotaxina	RD
anti-MBP	Santa Cruz
anti-RANTES	Abnova
anti-IL-25	Abnova
anti-IDO	Abnova

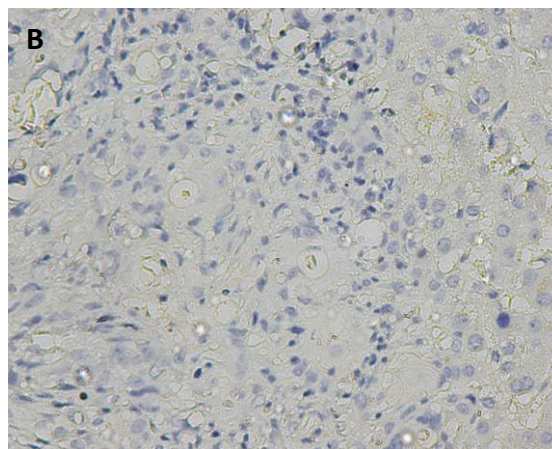
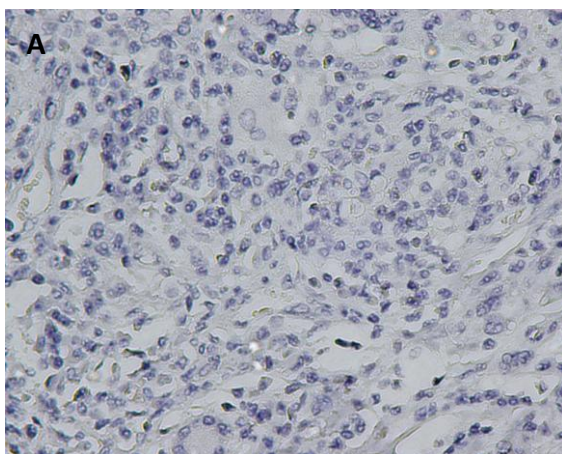


Figura 33: Controle negativo da imuno-histoquímica das biópsias de linfonodo (A) e fígado (B) de pacientes com a forma juvenil da PCM (400X).

4. Análise da produção de peróxido de hidrogênio por eosinófilos de pacientes com a forma juvenil da PCM e doadores sadios (controles)

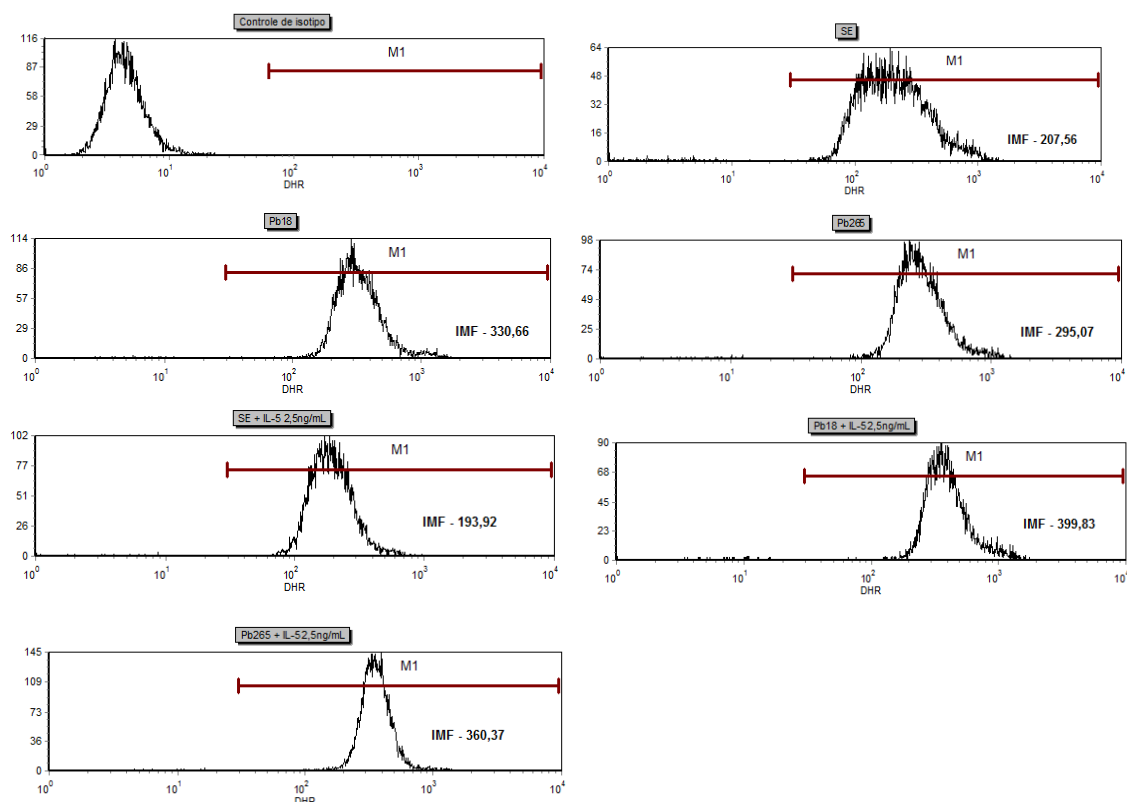


Figura 34: Gráficos de representativos da análise da intensidade média de fluorescência (IMF) do metabólito fluorescente da dihidrorodamina-1,2,3 para a determinação da produção de peróxido de hidrogênio pelos eosinófilos após cultura de 4 horas na presença ou ausência de leveduras de *P. brasiliensis* das cepas Pb18 ou Pb265 (proporção 1:100).

5. Atividade fungicida direta de eosinófilos em diferentes proporções com as células fúngicas

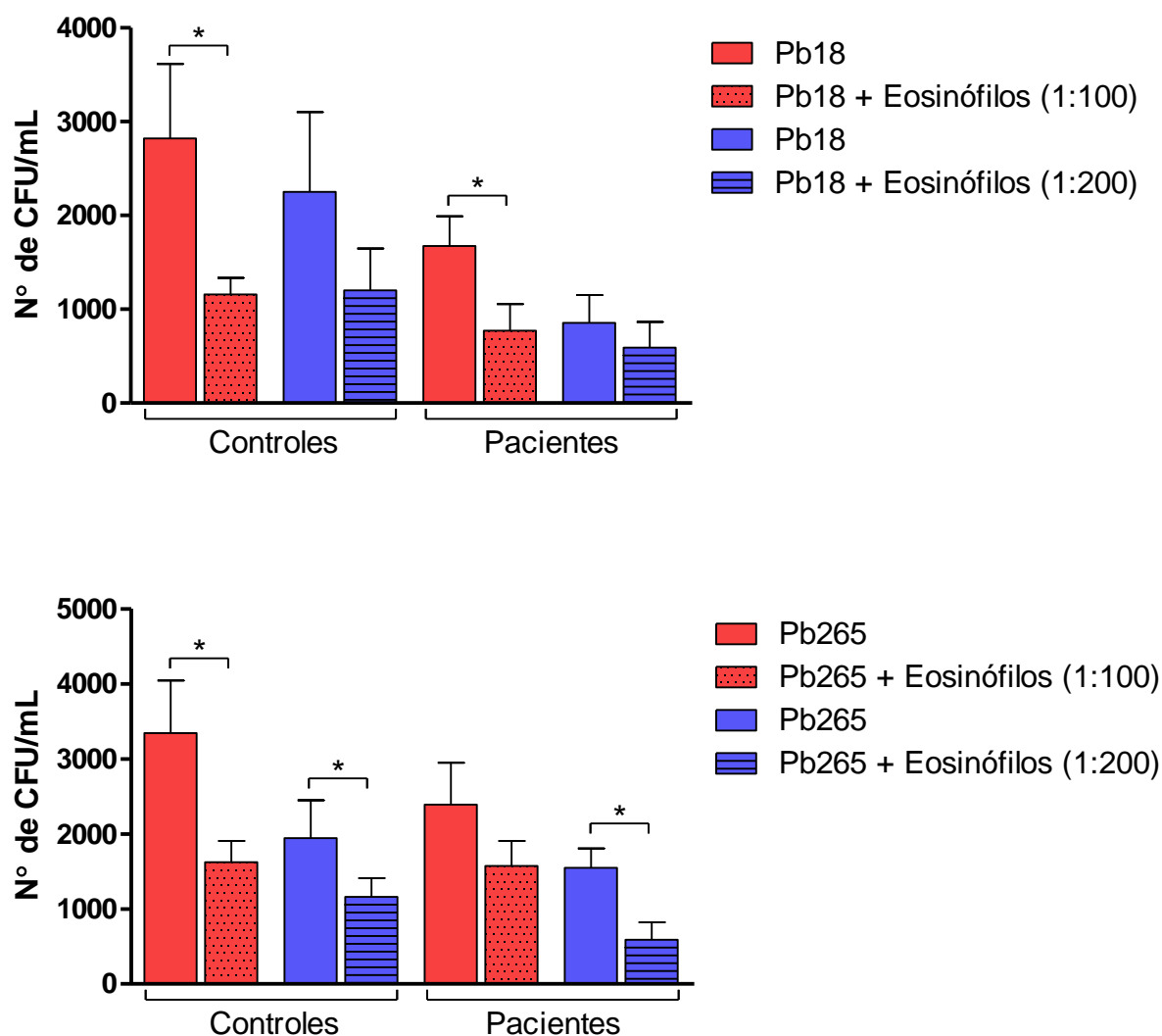


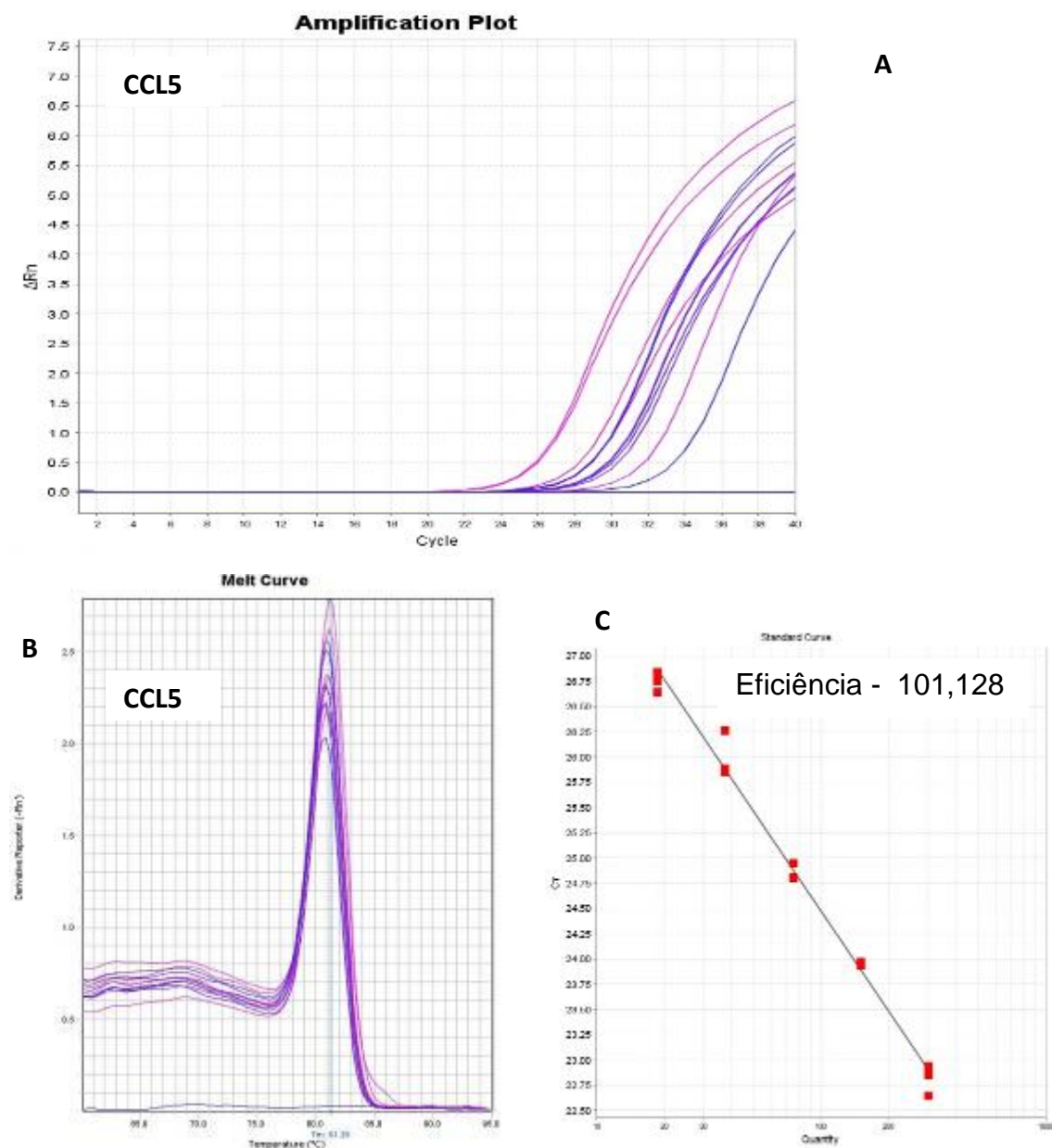
Figura 35: Número de CFUs/mL a partir de sobrenadante obtido após cultura de 4 horas de células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepas Pb18 ou Pb265) na presença ou não de eosinófilos de **doadores saudáveis e pacientes com a forma juvenil da PCM** na proporção de 1 levedura para cada 100 eosinófilos (1:100) e 1 levedura para cada 200 eosinófilos (1:200). Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao Nº de CFUs de leveduras cultivadas sem a presença de eosinófilos.

6 .Tabela VI: Sequências dos *primers* utilizados na reação de qRT-PCR.

“Primer”	Cadeia	Seqüência (5' → 3')	Eficiência
GAPDH	Sense	TGC ACC ACC ACC TGC TTA GC	102,739%
	Anti-sense	GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG	
IL-1 β	Sense	CAC GAT GCA CCT GTA CGA TCA	101,964
	Anti-sense	AGA CAT CAC CAA GCT TTT TTG CT	
IL-2	Sense	AGT CCC TGG GTC TTA AGT GAA AG	97,164
	Anti-sense	CAA GAA GGC CCA AGA ACT GAA	
IL-4	Sense	CTGCAAATCGACACCTATTAATGG	99,697
	Anti-sense	GCACATGCTAGCAGGAAGAACA	
IL-8	Sense	ACC GGA AGG AAC CAT CTC ACT	102,537
	Anti-sense	ATC AGG AAG GCT GCC AAG AG	
CCL5	Sense	GCATCTGCCTCCCCATATTC	101,128%
	Anti-sense	AGTGGGCGGGCAATGTAG	
MBP	Sense	GGTTTCCATCCACAACCTTCAATATT	99,161%
	Anti-sense	TGCCTCCAATCCAGACTTGAC	
EPO	Sense	TGTTCCGCTTGGACAGTCAGT	93,845%
	Anti-sense	CTGGCAAAGAAGGCAGAGCTA	
ECP	Sense	TTGCCATCCAGCACATCAGT	95,089%
	Anti-sense	GTTAATTGCCCGCATTGCA	
EDN	Sense	CCAGCAAACATGTTCTATATAGTTGCA	102,127%
	Anti-sense	GAACTGGAACCACCGGATACTG	

7. Determinação da eficiência e especificidade de amplificação dos *primers* utilizados na técnica de qRT-PCR

Na figura 32 estão representados resultados da padronização da reação de qRT-PCR para CCL5 (Figura 32 A, B e C) e ECP (Figura 32 D, E e F): reação de amplificação dos *primers* (Figura 32 A e D), eficiência da reação de amplificação (figura 32 C e F) e curva de *melting* das reações (figura 32 B e E).



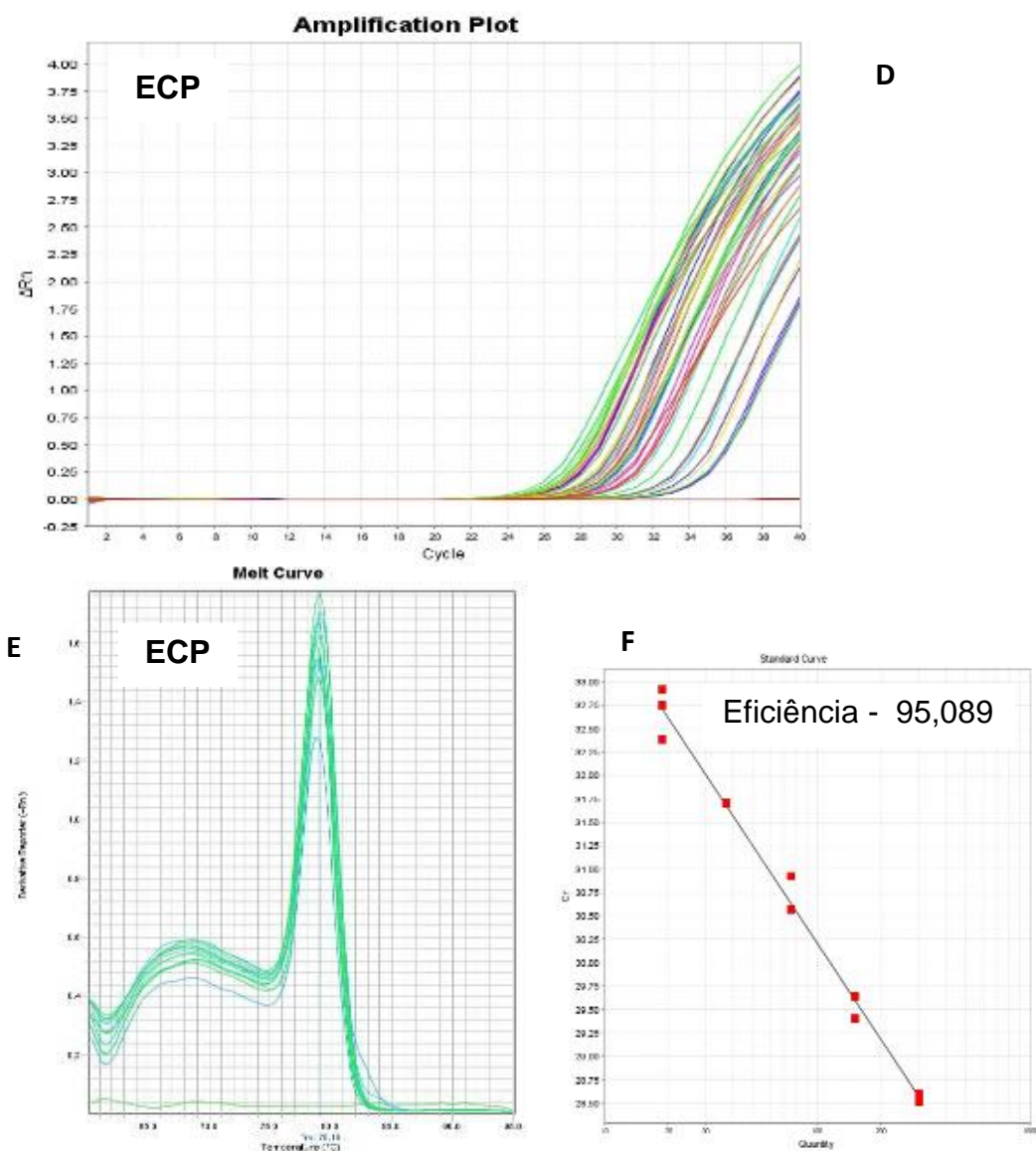


Figura 36 (página acima e anterior): Gráficos representativos da padronização da reação de qRT-PCR para CCL5 (A, B e C) e ECP (D, E e F). Todos os testes foram realizados em triplicata utilizando amostras de cDNA (300ng / reação). Os gráficos A e D mostram a amplificação do material de acordo com a diluição das amostras, por meio do qual foi gerada a curva padrão expressa como a média dos CTs em função da diluição da amostra. As amostras foram diluídas de forma seriada na proporção de 1:2 (5 pontos). Os valores eficiência da reação estão destacados em cada gráfico (C e F). É possível observar que a reação utilizando os “primers” na concentração descrita é específica, uma vez que todas as amostras testadas apresentam temperatura de “melting” (T_m) idênticas (B e E).